

Evaluation wundheilungsfördernder Therapieoptionen durch In-vitro-Prüfung an Zellkulturmodellen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Christian Weber
aus Flensburg

1. Referentin: Professor Dr. Christel Müller-Goymann

2. Referent: Professor Dr. Manfred Kietzmann

eingereicht am: 30.09.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.01.2009

Druckjahr 2009

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Attama A. A., Weber C., Müller-Goymann C. C. (2008) Assessment of drug permeation from lipid nanoparticles formulated with a novel structured lipid matrix through artificial skin construct bio-engineered from HDF and HaCaT cell lines, J Drug Deliv Sci Tech 18 (3) 181-188

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2008) Artificial skin constructs as a novel approach for evaluating regenerative treatments, Eur J Dermatol (eingereicht)

Savić S., Weber C., Tamburić S., Savić M., Müller-Goymann C. C. (2008) Topical vehicles based on natural surfactant / fatty alcohols mixed emulsifier: The influence of two polyols on the colloidal structure and in vitro / in vivo skin performance, J Pharm Sci (zur Publikation angenommen)

Tagungsbeiträge

Vorträge

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2007) Dexpanthenol as regenerative agent for SDS-traumatized artificial skin constructs, DPhG Jahrestagung, Erlangen

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2008) Improvement of a cell line's proliferation properties by using a full factorial design of experiments, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2008) Artificial skin constructs for evaluating regenerative treatments: Proof of concept and limitations, 2nd Midnight Sun Meeting on Drug Transport & Delivery, Tromsø

Poster

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2006) Comparison of the viability of three cell lines derived from human skin using an ATP-measuring assay, 6th International Conference and Workshop on Cell Culture, Saarbrücken

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2006) Investigation of the regenerative potential of dexpanthenol in an in vitro assessment using traumatized artificial skin constructs (ASC), 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf

Attama A. A., Weber C., Müller-Goymann C. C. (2006) Permeation of some model drugs from SLN formulated with novel structured lipid matrix through artificial skin construct, 33rd Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, Wien

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2006) Influence of dexpanthenol on cell viability of artificial skin constructs, 2nd Skin and Formulation Symposium, Versailles

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2008) Two potential wound healing treatments evaluated by application of three-dimensional artificial skin constructs, 7th International Conference and Workshop on Cell Culture, Saarbrücken

Weber C., Müller-Goymann C. C. (2008) Application of threedimensional artificial skin constructs as in vitro model for evaluating the regenerative potential of active ingredients and preparations thereof, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona

Savić S., Weber C., Savić M., Müller-Goymann C. C. (2008) Natural surfactant-based topical vehicles: Influence of two different polyols on in vitro / in vivo skin performance, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von Frau Professor Dr. Christel C. Müller-Goymann.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

möchte ich meinen herzlichen Dank für die Zuweisung des Themas, die freundliche Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft aussprechen.

Herrn Professor Dr. Manfred Kietzmann danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Knut Baumann vom Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig danke ich für die Unterstützung bei der Beantwortung statistischer Fragestellungen und für seine Anregungen zur Optimierung von HPLC-Methoden unter statistischen Gesichtspunkten.

Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter vom Institut für Lebensmittelchemie gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Durchführung von quantitativen HPTLC-Untersuchungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Norbert E. Fusenig möchte ich mich für die Überlassung der Keratinocytenzelllinie HaCaT bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Technologie für die kollegiale Zusammenarbeit, die konstruktive Atmosphäre und das freundliche Miteinander. Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen und Freunden Katrin Lübbers, Timo Paepenmüller und Jan Finke für die Diskussionsbereitschaft meiner Resultate aus physikochemischer Sicht. Bei Dr. Stephan Reichl, Dr. Christine Hoffmann, Stefanie Döring und Gesa Grobe bedanke ich mich für die Einführung in die Zellkulturtechniken, den fachlichen Rat und die ständige Ansprechbarkeit. Manuela Handt, Dagmar Hahne und Ulrike Kruse danke ich für die Unterstützung und Hilfe im Zellkulturlabor.

Meinem Mann Marcus danke ich für die Unterstützung während schwieriger Phasen der experimentellen Arbeit sowie für seinen Rückhalt während der Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift.

"Essentially, all models are wrong, but some are useful."
George E. P. Box und Norman R. Draper

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Einleitung und Problemstellung | 1 |
| 2 | Allgemeiner Teil | 3 |
| 2.1 | Humane Haut | 3 |
| 2.1.1 | Anatomie der Haut | 3 |
| 2.1.1.1 | Epidermis | 3 |
| 2.1.1.2 | Dermis | 8 |
| 2.1.1.3 | Subcutis | 9 |
| 2.2 | Wundheilung der humanen Haut | 9 |
| 2.2.1 | Wundklassifikation | 9 |
| 2.2.2 | Latenzphase | 10 |
| 2.2.3 | Exsudative Phase | 10 |
| 2.2.4 | Proliferative Phase | 11 |
| 2.2.5 | Epithelisierungsphase | 11 |
| 2.3 | Evaluierte Wirkstoffe und Wirkstoffzubereitungen | 13 |
| 2.3.1 | Dexpanthenol | 13 |
| 2.3.2 | Becaplermin | 15 |
| 2.3.3 | Epoetin beta | 16 |
| 2.4 | Zellkulturen und Zellmodelle | 17 |
| 2.4.1 | Kultivierung von dermalen Zellen im Monolayer | 18 |
| 2.4.1.1 | Fibroblasten | 18 |
| 2.4.1.2 | Keratinocyten | 18 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.2 | Kokultivate | 19 |
| 2.4.3 | Organotypische Hautäquivalente | 20 |
| 2.5 | Zelluläre Assays | 21 |
| 2.5.1 | Allgemeines | 21 |
| 2.5.2 | Vitalitätsassays | 21 |
| 2.5.2.1 | Begriffsbestimmung | 21 |
| 2.5.2.2 | Vitalitätsassays auf Tetrazoliumsalzbasis | 24 |
| 2.5.2.3 | Vitalitätsassays auf Resazurin-Basis | 26 |
| 2.5.2.4 | Vitalitätsassays auf Biolumineszenzbasis | 28 |
| 3 | Material und Methoden | 30 |
| 3.1 | Material | 30 |
| 3.1.1 | Dexpanthenol | 30 |
| 3.1.2 | Verwendete Fertigarzneimittel | 30 |
| 3.1.2.1 | Regranex | 30 |
| 3.1.2.2 | NeoRecormon | 30 |
| 3.2 | Methoden | 31 |
| 3.2.1 | Humane Zellkulturen | 31 |
| 3.2.1.1 | Humane dermale Fibroblasten | 31 |
| 3.2.1.2 | Primäre humane Keratinocyten | 31 |
| 3.2.1.3 | HaCaT-Zelllinie | 32 |
| 3.2.2 | Monolayerkultivierung | 32 |
| 3.2.3 | Kryokonservierung | 33 |
| 3.2.4 | Proliferationsuntersuchungen | 33 |
| 3.2.5 | Osmolalitätsmessungen | 34 |
| 3.2.6 | Identifizierung von Mykoplasmeninfektionen | 35 |
| 3.2.7 | Kultivierung organotypischer Hautkonstrukte | 35 |
| 3.2.8 | Charakterisierung organotypischer Hautkonstrukte | 37 |
| 3.2.8.1 | Histologische Charakterisierung | 37 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.8.2 | Permeationsuntersuchungen | 40 |
| 3.2.8.3 | Metabolisierungsversuche | 41 |
| 3.2.9 | Vitalitätsmessungen | 43 |
| 3.2.9.1 | Lumineszenz-Assay (ATP-Assay) | 43 |
| 3.2.9.2 | Kolorimetrischer Assay (MTT-Assay) | 46 |
| 3.2.10 | Studienaufbau zur Regenerationsmessung am Monolayer | 47 |
| 3.2.11 | Studienaufbau zur Evaluation von Arzneistoffen und Arzneistoff- zubereitungen | 47 |
| 3.2.11.1 | Allgemeiner Aufbau | 47 |
| 3.2.11.2 | Dexpanthenol-Studie | 49 |
| 3.2.11.3 | Epoetin beta-Studie | 49 |
| 3.2.11.4 | Becaplermin-Studie | 50 |
| 3.2.11.5 | Hydrogel-Studie | 50 |
| 4 | Versuchsergebnisse und Diskussion | 51 |
| 4.1 | Proliferationsuntersuchungen | 51 |
| 4.1.1 | Bestimmung der Proliferation der kultivierten Zellarten | 51 |
| 4.1.2 | Vollfaktorieller Versuchsplan zur Optimierung der Proliferation der HaCaT-Zelllinie | 52 |
| 4.2 | Osmolalitätsmessungen | 55 |
| 4.3 | Regenerationsversuche am Monolayer | 55 |
| 4.4 | Charakterisierung von Hautäquivalenten | 58 |
| 4.4.1 | Organotypische Hautäquivalente | 58 |
| 4.4.2 | Miniaturisierte organotypische Hautäquivalente | 58 |
| 4.5 | Dexpanthenol-Metabolisierung | 59 |
| 4.6 | Evaluierung des Regenerationsmodells organotypisches Hautäquivalent . . | 62 |
| 4.6.1 | Ermittlung der IC_{50} zur Herstellung der traumatisierenden SDS- Lösung | 62 |
| 4.6.2 | Alterungsstabilität | 62 |
| 4.6.3 | Dexpanthenol-Studie | 64 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.6.3.1 | MTT-Test | 64 |
| 4.6.3.2 | ATP-Test | 66 |
| 4.6.3.3 | Histologische Analyse | 69 |
| 4.6.3.4 | Zwischenfazit | 73 |
| 4.6.4 | Becaplermin-Studie | 74 |
| 4.6.4.1 | MTT-Test | 74 |
| 4.6.4.2 | ATP-Test | 76 |
| 4.6.4.3 | Histologische Analyse | 78 |
| 4.6.4.4 | Zwischenfazit | 78 |
| 4.7 | Evaluierung von Wirkstoffen und Wirkstoffzubereitungen am Regenerationsmodell | 80 |
| 4.7.1 | Epoetin beta-Studie | 80 |
| 4.7.1.1 | MTT-Test | 80 |
| 4.7.1.2 | ATP-Test | 83 |
| 4.7.1.3 | Histologische Untersuchungen | 86 |
| 4.7.1.4 | Zwischenfazit | 86 |
| 4.7.2 | Hydrogel-Studie | 87 |
| 4.7.2.1 | MTT-Test | 87 |
| 4.7.2.2 | ATP-Test | 88 |
| 4.7.2.3 | Zwischenfazit | 90 |
| 5 | Abschlussdiskussion | 91 |
| 5.1 | Monolayer als Screeningmethoden | 91 |
| 5.2 | Charakterisierung von Hautäquivalenten | 92 |
| 5.3 | Modellarzneistoffe: Evaluierung des Konzepts | 93 |
| 5.4 | Evaluation neuer Therapieoptionen | 94 |
| 6 | Zusammenfassung | 96 |
| | Literaturverzeichnis | 98 |

Kapitel 1

Einleitung und Problemstellung

Dreidimensionale Zellkulturen haben im Rahmen des sogenannten „Tissue-Engineering“ große Bedeutung in der naturwissenschaftlichen Forschung erreicht. Weit verbreitet sind z. B. rekonstruierte Gewebe der Haut, der Augencornea und des Lungengewebes als Modelle zur Evaluierung zytotoxischen und irritativen Potentials von Noxen oder zur Identifizierung von Arzneistoffformulierungen im Rahmen von Permeationsuntersuchungen für die weitere präklinische und klinische Forschung. Die genannten Modelle stellen zwar Simplifizierungen des im Organismus exprimierten Gewebes dar, da sie beispielsweise eine weniger komplexe Matrix oder nur eine Auswahl der vorhandenen funktionellen Zellarten enthalten, dennoch gehen sie in ihrer Komplexität über in der Regel leichter kultivierbare und einfacher zugängliche Monolayerkulturen hinaus. Daraus ergibt sich, dass bestimmte Fragestellungen, die z. B. aufgrund eines nicht vorhandenen Crosstalks zwischen Zellarten bzw. einer unterbliebenen Differenzierung am Monolayer nicht oder nicht realitätsnah abgebildet werden können, eher einer Beantwortung unter Zuhilfenahme von dreidimensionalen Zellkulturen zugänglich sein können. Insoweit leisten dreidimensionale Zellkulturen einen Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen und klinischen Studien, indem Hinweise auf die Zytotoxizität von Substanzen oder die fehlende Eignung von galenischen Formulierungen bereits beim Screening an Zellkulturen gewonnen werden. Aufgrund des öffentlichen Interesses an diesen Fragestellungen existieren auf diesem Themenfeld auch staatlich initiierte Forschungsprojekte [1].

Am Institut für Pharmazeutische Technologie wurde in aktuellen und früheren Arbeiten neben Modellen der Augencornea [2, 3, 4, 5, 6] und des Nasalepithels [7] auch ein Modell rekonstruierter Humanhaut entwickelt und charakterisiert, das dermale und epidermale Strukturen enthält [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Dieses dreidimensionale Hautkonstrukt wurde im wesentlichen als Werkzeug zu Permeationsuntersuchungen vorgeschlagen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte davon ausgehend die Frage beleuchtet werden, inwiefern auch ein

Einsatz der Hautkonstrukte zum Screening von Wirkstoffen und deren Formulierungen in Bezug auf deren wundheilungsfördernde Eigenschaften in Betracht kommt. Weiterhin war von Interesse, ob die Durchführung entsprechender Prüfungen das komplexe System Hautkonstrukt erfordert oder ob auch der Einsatz einfacher und ressourcensparend zu kultivierender Systeme wie z. B. der von Monolayern denkbar sein könnte.

Kapitel 2

Allgemeiner Teil

2.1 Humane Haut

2.1.1 Anatomie der Haut

Mit einer durchschnittlichen, je nach Körperform und Körpergröße schwankenden Oberfläche von 1,5-2,0 m² handelt es sich bei der menschlichen Haut um das größte Organ des Organismus, das einerseits zahlreiche und zum Teil lebenswichtige Funktionen des Körpers übernimmt, andererseits aber auch als Applikationsstelle für Arzneimittel und Kosmetika von Interesse ist [14]. Funktionell übernimmt die Haut die Aufnahme und Weitergabe von Sinneseindrücken nach Berührungs-, Druck-, Schmerz- oder Temperatureizen, schützt tiefer gelegene Strukturen gegen äußere Einwirkungen, reguliert den Temperaturhaushalt und übernimmt die Barrierefunktion gegenüber dem Eindringen von pathogenen Mikroorganismen, chemischen Noxen oder ultravioletter Strahlung. Zusätzlich reguliert die Haut die Wasserabgabe an die Umgebung [15].

Eine histologische Unterteilung der Haut kann in drei Hauptschichten vorgenommen werden (vgl. Bild 2.1): Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut). Der lateinische Begriff für Haut, Cutis, bezeichnet zusammenfassend Epidermis und Dermis. Auch die Hautanhangsgebilde werden zum Organ Haut gerechnet, d. h. Haare, Nägel und Drüsen [16].

2.1.1.1 Epidermis

Die Epidermis stellt die äußerste Schicht der menschlichen Haut dar und leistet den weitaus größten Beitrag zur Barrierefunktion der Haut. Diese Barrierefunktion bezieht sich nicht nur auf die Reduzierung des Wasserverlustes aus der Haut heraus und auf die

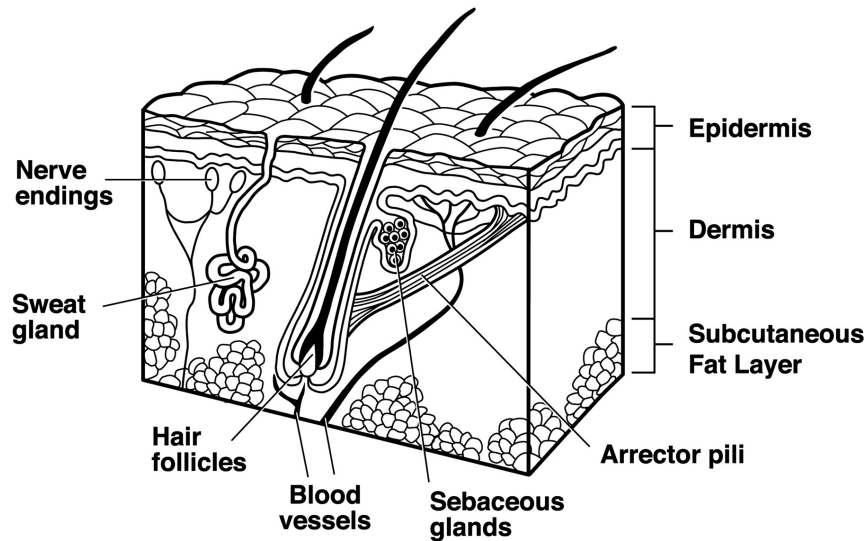


Abb. 2.1: Der schematische Aufbau der Haut mit den drei Hauptzellverbänden Epidermis, Dermis und Subcutis; entnommen aus [17]

Abwehr äußerer Einflüsse, sondern muss auch überwunden werden, um z. B. eine transdermale Arzneistofftherapie zu ermöglichen. Die vorherrschend anzutreffenden Zellen der Epidermis sind die Keratinocyten, die im Laufe von etwa 30 Tagen ausdifferenzieren und schließlich abgeschilfert werden, nachdem sie zu toten Korneocyten gereift sind [16]. Neben den Keratinocyten, die ca. 80 % der Zellpopulation ausmachen [18], sind Melanocyten, Langerhans-Zellen sowie Merkel-Zellen in der Epidermis anzutreffen, die für die Hautpigmentierung, für die Immunabwehr bzw. für die Reizweiterleitung notwendig sind [19].

Basalschicht

Die Epidermis unterliegt einer ständigen Erneuerung, die durch die Abschilferung von Korneocyten aus der obersten epidermalen Zellschicht, dem Stratum corneum, sowie nach oberflächlichen Verletzungen notwendig wird. Der Ersatz abgeschilfter Zellen wird durch teilungsaktive Zellen der Basalzellschicht, des Stratum basale, gewährleistet. Die mitotische Aktivität der basalen epidermalen Zellen unterliegt einer physiologischen Kontrolle, da zu geringe Proliferationsraten zu einer Atrophisierung der Epidermis führen, während eine enthemmte Proliferation kennzeichnend für Psoriasis und Neoplasien ist [20]. Um die Proliferation zu kontrollieren, wird bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte in der Basalzellschicht die zellteilungsaktivierende MAP-Kinase-Kaskade gehemmt, und zwar angeregt durch die Zunahme an E-Cadherin, das als transmembranäres Adhärenzprotein den Zusammenhalt der Basalzellen vermittelt [21].

Da die Basalzellen auf ihrer Unterlage, der Basalmembran, durch Integrine verankert

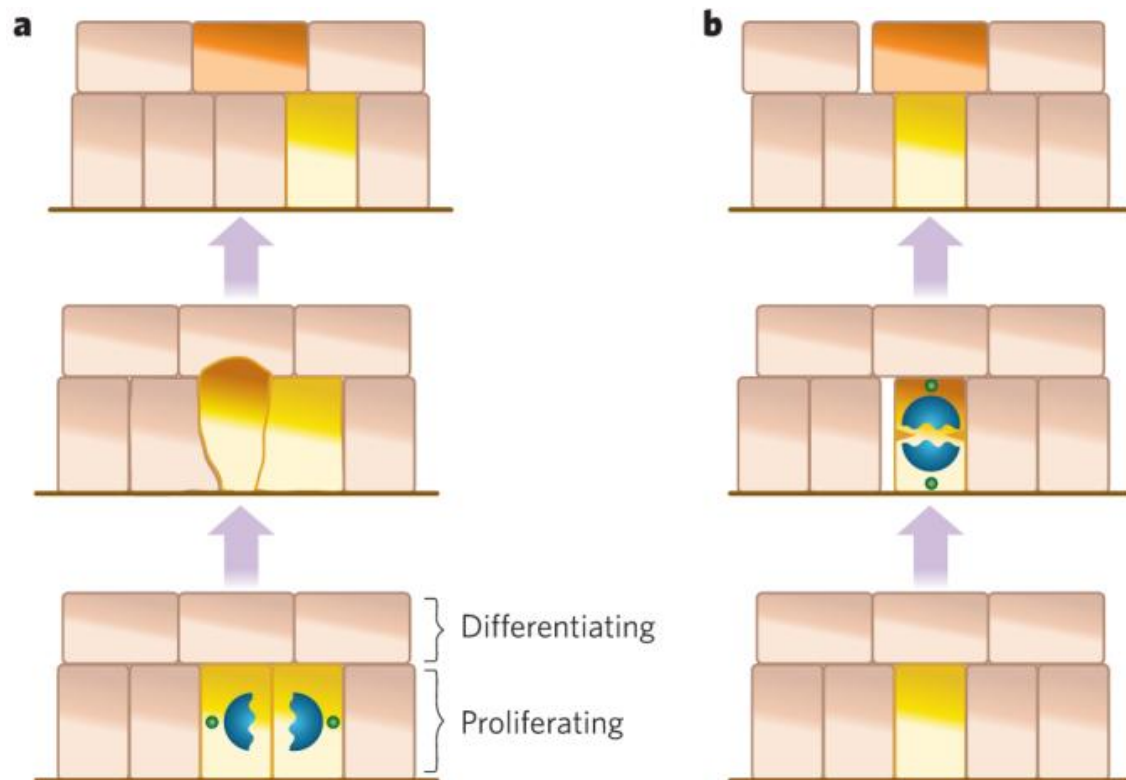


Abb. 2.2: Aufstieg von Keratinocyten aus der Basalzellschicht: Symmetrische (a) und asymmetrische Teilung (b), entnommen aus [20]

sind [22], sind zwei Mechanismen möglich und in der Literatur beschrieben um den Keratinocyten den Aufstieg in höher gelegene Zellschichten in der holokrinen Epidermis zu ermöglichen (vgl. Bild 2.2): Einerseits können aus einer Mitose zwei direkt mit der Basalmembran verknüpfte Zellen hervorgehen, von denen eine die Basalmembran verlassen wird und der folgenden Differenzierung unterliegt, während die andere Zelle im Stratum basale verbleibt (symmetrische Teilung). Man geht angesichts von Versuchen an Maushaut davon aus, dass diejenige Zelle, die über einen geringeren Gehalt an Integrinen verfügt, sich von der Basalmembran ablöst [23]. Im anderen Fall erfolgt eine asymmetrische Teilung, d. h. von vornherein kann nur eine der beiden entstehenden Zellen eine Verknüpfung mit der Basalmembran aufweisen, da die Teilungsachse parallel zur Basalmembran verläuft. Das Vorliegen beider Mechanismen nebeneinander wird in der Literatur als möglich angesehen [20]. Aufgrund der hohen mitotischen Aktivität kann z. B. ein UV-induzierter DNA-Schaden in Zellen der Basalzellschicht Neoplasien wie das Basalzellkarzinom hervorrufen. Hierfür wird vor allem die UV-B-Strahlung verantwortlich gemacht, die die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren durch [2+2]-Cycloaddition an der DNA hervorruft [24, 25, 26]. Die Basalzellschicht liegt den Papillen der Dermis wellenförmig auf und ist über die Basalmembran mit der Dermis verknüpft [19].

Ausgehend von der Basalzellschicht sind histologisch weitere Epidermisschichten gegen-

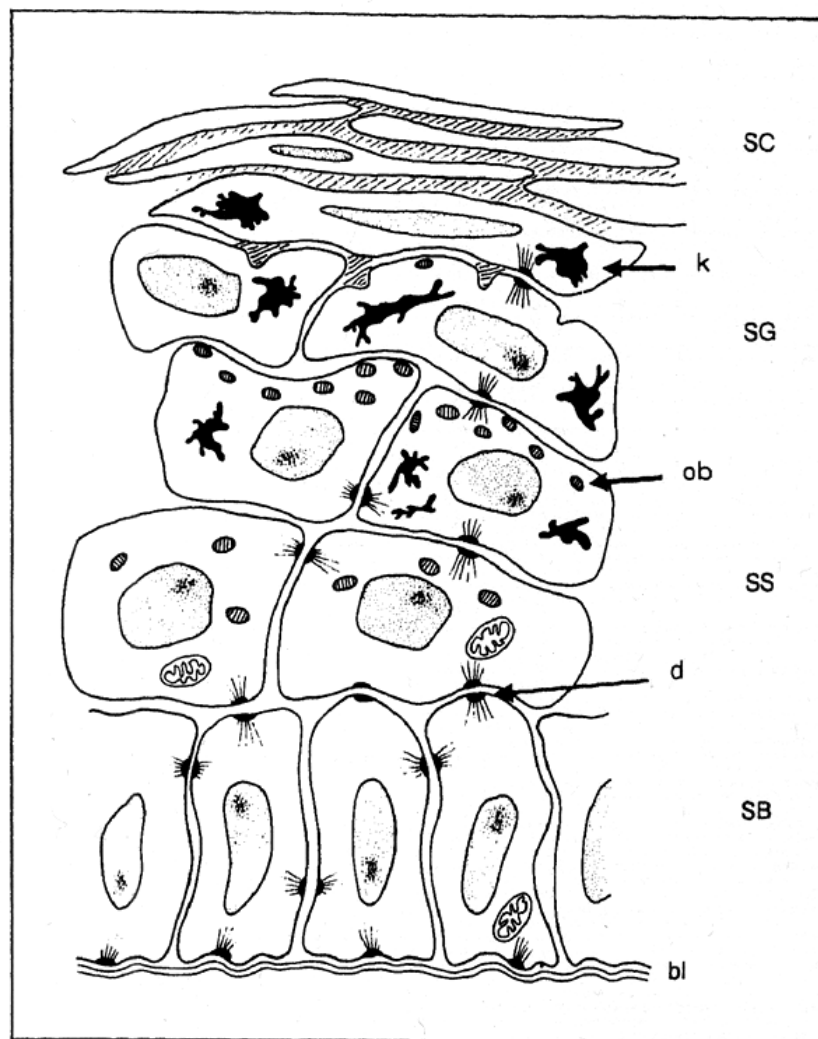


Abb. 2.3: Humane Epidermis im schematischen Querschnitt: Stratum basale (SB), Stratum spinosum (SS), Stratum granulosum (SG), Stratum corneum (SC); nicht dargestellt das nur in der Leistenhaut auftretende Stratum lucidum. Entnommen aus [27].

einander differenzierbar, bis die Hornschicht erreicht wird (vgl. Bild 2.3): Stachelzell-schicht, Körnerzellschicht und Glanzschicht.

Stachelzellschicht

Eine starke Vernetzung der Keratinocyten über Desmosomen führt zu einer stachelzellar-tigen Morphologie, die der Stachelzellschicht ihren Namen gibt. In dieser Zellschicht, die nur noch eine geringe mitotische Aktivität aufweisen kann, wird die Bildung der Odland bodies initiiert, die zu einem späteren Differenzierungsstadium hin diejenigen Lipide in der Epidermis freisetzen, die für deren Barrierefunktion bedeutend sind [27].

Körnerzellschicht

Die Körnerzellschicht trägt ihren Namen aufgrund der hier feststellbaren Keratohyalinkörner, welche mit Profilaggrin einen Vorläufer von Filaggrin enthalten und damit zum Keratinfaseraufbau beitragen können [19]. In jüngerer Zeit wird in der Literatur diskutiert, ob das Vorliegen von tight junctions in dieser Zellschicht einen signifikanten Beitrag zur Permeabilitätsbarriere Haut liefern kann, nachdem Markerproteine für tight junctions, wie Occludin und Claudin-1 in der Körnerzellschicht über Immunofluoreszenz nachgewiesen werden konnten [28]. Die Mehrzahl der Autoren weist den in der Hornschicht vorkommenden und aus den Odland bodies hervorgehenden interzellulären Lipiden den weitaus überwiegenden Anteil am Zustandekommen der Barrierefunktion zu, anstatt Strukturen der lebenden Epidermis einen hohen Stellenwert zuzuschreiben, da entsprechende Strukturen nicht oder nur fragmentarisch angetroffen wurden [29, 30].

Glanzschicht

Nur an der Leistenhaut (Handinnenflächen und Fußsohle) kann die Glanzschicht aufgefunden werden, die im histologischen Schnittbild durch ein transluzentes Bild auffällt. Diese optische Eigenschaft wird durch den hohen Gehalt von Eleidin im Cytoplasma hervorgerufen, welches möglicherweise eine Vorstufe des Keratins darstellt und das wahrscheinlich aus dem Abbau der Keratohyalinkörper entsteht [16, 19].

Hornschicht

Anschließend an die Glanzschicht in der Leistenhaut bzw. die Körnerzellschicht in der Felderhaut lässt sich mit der Hornschicht die äußerste epidermale Zellschicht feststellen, in der sich die Keratinozyten in verhornte, tote Korneocyten umgewandelt haben, die nach dem klassischen Backstein-Mörtel-Modell von interzellulären Lipiden umgeben sind [31]. Ceramide, freie Fettsäuren und Cholesterol bauen die Lipidschicht auf, die als Permeationsbarriere für eindringende Noxen oder Arzneistoffe fungiert [32]. Unter dem Eindruck, dass das etablierte Backstein-Mörtel-Modell die enorme mechanische Festigkeit der Hornschicht nicht zufriedenstellend erklären kann, wird ein korrigiertes Modell postuliert [33], das eine Verhakung der Korneocyten, eine Verknüpfung der Korneocyten durch Corneodesmosomen, das Vorkommen funktionstüchtiger tight junctions zwischen lebenden und toten Epidermisschichten sowie eine modifizierte Struktur der Lipidlayer des Stratum corneum enthält. Nach Modellberechnungen soll hiernach zwischen den Lipidlayern nur eine Wasserschicht von 0,16 nm Dicke feststellbar sein. Hieraus ergibt sich, dass für den Arzneistofftransport durch die Hornschicht hindurch vor allem der inter-

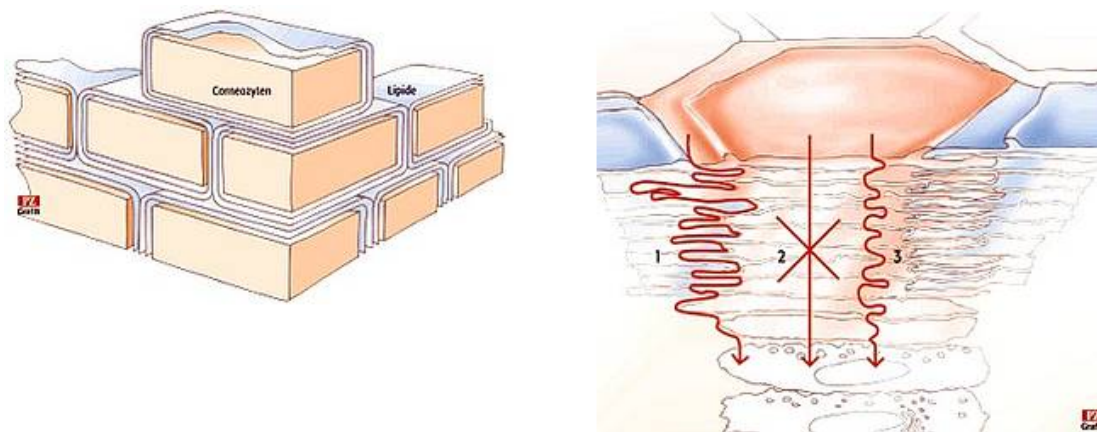


Abb. 2.4: Modellvorstellungen zur Struktur des Stratum corneum: Backstein-Mörtel-Modell (links), modifiziertes Modell (rechts) mit den vorstellbaren Permeationsrouten interzellulär (1), transzellulär (2) und corneodesmosomal (3); entnommen aus [33].

zelluläre Weg sowie der corneodesmosomale Weg als wahrscheinlich erachtet werden, wohingegen dem transzellulären Weg entgegen der früheren Auffassung in der Literatur keine Bedeutung zugemessen wird (vgl. Abbildung 2.4).

2.1.1.2 Dermis

Unterhalb der Basalmembran befindet sich die auch als Lederhaut oder Corium bezeichnete Dermis. Neben den hier hauptsächlich anzutreffenden Fibroblasten können auch Mastzellen und Makrophagen vorgefunden werden. Das Gewebe erlangt seine Elastizität durch das Vorhandensein von Strukturproteinen wie dem Kollagen I, in welches die Zellen der Dermis eingebettet sind. Kollagen wird hierbei als Prokollagen von Fibroblasten sezerniert und assoziiert zum Heterotrimer Kollagen I aus zwei α -1 Ketten und einer α -2 Kette [34]. Neben diesen bindegewebsmäßigen Bestandteilen enthält die Dermis auch Gefäße und neurale Gewebe, die die Lederhaut durchziehen. Eine Unterscheidung der Dermis in Zapfen- und Netzsicht ist möglich; die Zapfenschicht (Stratum papillare) übernimmt die Verbindung mit der aufliegenden Epidermis. Hierbei vergrößert die wellenförmige Auflageart die Diffusionsfläche für den Nährstofftransport aus der gefäßdurchzogenen Dermis in die gefäßfreie Epidermis. Die tieferen Bereiche der Dermis können der Netzsicht (Stratum reticulare) zugeordnet werden, die ein dichtes Netzwerk aus Strukturproteinen enthält und eine geringere Zellbesiedelung aufweist [16, 19, 18]. Bekannt ist, dass sich die Fibroblastenpopulationen der beiden Dermissschichten voneinander unterscheiden: Nach Trennung der beiden Schichten und separater Kultivierung der Fibroblastenpopulationen wiesen die papillären Fibroblasten eine höhere Populationsrate auf, wohingegen retikuläre Fibroblasten Kollagenmatrices stärker kontrahieren

konnten [35].

Im Rahmen der natürlichen (intrinsischen) Hautalterung nimmt die Dicke der Dermis um ca. 20 % ab, was unter anderem auf den verstärkten Abbau von Kollagen I und dessen verringerte Neusynthese in Fibroblasten zurückzuführen ist. Hierbei nimmt die Kollagenkonzentration pro Lebensjahr um ca. 1 % ab, während sich der Quotient von Kollagen III- zu Kollagen I-Anteil zu Ungunsten des Kollagen I verschiebt. UV-A-Strahlung gilt als extrinsischer Aktivator der Hautalterung [36].

2.1.1.3 Subcutis

Die Subcutis (auch: Hypodermis) kann morphologisch nicht scharf von der Dermis abgegrenzt werden; sie vermittelt als Bindegewebe die Verankerung der Haut zu den darunter liegenden Knochen oder Muskeln und wird häufig nicht der Haut, sondern den oberflächlichen Faszien zugerechnet, also den bindegewebigen Umhüllungen der Muskeln. Als Speicher und Thermoregulator fungiert das subcutane Fettgewebe [18, 19, 37].

2.2 Wundheilung der humanen Haut

2.2.1 Wundklassifikation

Nach Entstehung, Tiefe und Ausdehnung der Wunde kann unterschieden werden zwischen mechanischen bzw. traumatischen Wunden, thermischen bzw. chemischen Wunden sowie Geschwürwunden.

Mechanische Wunden entstehen nach Gewalt- oder Krafteinwirkung und können geschlossener Natur sein, das heißt sie zeichnen sich durch Verletzungen der unter der Haut befindlichen Gewebe aus. Oberflächliche Wunden betreffen lediglich die Epidermis; derartige Wunden sind zur narbenfreien Regeneration befähigt; bei Beteiligung tiefer gelegener Hautareale und u. U. auch darunter gelegener Gewebe z. B. in Folge von Bisswunden wird von perforierenden Wunden gesprochen, deren Heilungstendenz unterschiedlich ausfallen kann und mit der Bildung von Narbengewebe einhergeht. Treten schwere Weichteilquetschungen oder offene Frakturen auf, bezeichnet man dies als komplizierte Wunde.

Nach Einwirkung von Hitze werden die auftretenden thermischen Wunden in vier Schweregrade eingeteilt: Grad I mit Schädigung der oberen Epidermis und Erythembildung; Grad IIa mit vollständiger Epidermischädigung und Blasenbildung (bei Grad IIb zusätzlich Verbrennung von Teilen der Dermis); Grad III mit vollständiger Zerstörung von

Epidermis, Dermis, teilweiser Beeinträchtigung der Subcutis sowie Nekrose und Grad IV, der Verkohlung der Haut bis hin zu Muskeln, Sehnen und Knochen betrifft. Wunden, die durch Säuren, Laugen oder Erfrierungen entstanden sind, werden dem gleichen Schema zugeordnet und analog behandelt.

Über eine unterschiedliche Genese kommen Geschwürwunden zustande; hierbei können als auslösende Faktoren nicht von außen einwirkende Ereignisse, sondern Störungen der Homöostase der Haut in Folge von Gefäßerkrankungen oder Neuropathien identifiziert werden. Im Falle des Decubitus sind lokale, länger währende Druckeinwirkungen für die Entstehung einer Geschwürwunde verantwortlich. Diese Wunden benötigen zum Abheilen in der Regel mehr als acht Wochen, so dass sie in die Kategorie der chronischen Wunden fallen [16].

2.2.2 Latenzphase

Werden durch die Verwundung der Haut Blutgefäße beschädigt, setzt zunächst die Blutgerinnung durch Verkleben von Thrombozyten und die Ausbildung eines Fibrinnetzes ein. Dies wird ermöglicht durch die von Thrombin katalysierte Spaltung von Fibrinogen. Im Fibrinnetz befinden sich außerdem Thrombozyten, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin. Durch die Aktivierung von Thrombozyten werden Zytokine in das Wundareal hinein freigesetzt, so dass es zur Chemotaxis von Neutrophilen und Monocyten kommen kann [38].

2.2.3 Exsudative Phase

Durch die Ausschüttung von Zytokinen werden innerhalb von Minuten Monocyten und Neutrophile in das Wundareal rekrutiert. Von den Neutrophilen ist bekannt, dass sie über die Ausschüttung von weiteren Zytokinen die erste Aktivierung von Fibroblasten und Keratinocyten in der Umgebung vornehmen können. Hierzu zählen Interleukin-1, Tumornekrosefaktor- α , Transforming growth factor α und β (TGF- α , TGF- β) und der thrombozytäre Wachstumsfaktor (PDGF). Anwesende Keime, die während der Verwundung in das Gewebe eindringen konnten, verstärken die Zytokinausschüttung. Blutplasma strömt vermehrt in das Interstitium ein (Exsudat); es zeigen sich die klassischen Entzündungszeichen Schmerz (Dolor), Schwellung (Tumor), Wärme (Calor), Rötung (Rubor) und ggf. eine beeinträchtigte Funktionalität (Functio laesa) [15, 16, 38].

2.2.4 Proliferative Phase

Granulationsgewebe beginnt den Wunddefekt aufzufüllen, indem Fibroblasten in das Fibrinnetz migrieren und von hier aus den Auffüllprozess initiieren. Die Aktivierung der Fibroblasten geht auf die im Wundareal sezernierten Zytokine zurück. Während der Aufbau des Granulationsgewebes voranschreitet, werden die Fibrinnetze abgebaut, neue Blutkapillaren angelegt und durch Fibroblasten Proteoglykane und zu Fasern assoziierendes Kollagen produziert, um die die Zelle umgebende Matrix wiederherzustellen [16].

Unter dem Einfluss von TGF- β und vermutlich auch von Mediatoren, die von Keratinocyten abgegeben werden, differenziert ein Teil der Fibroblasten zu Myofibroblasten, die das Wundgewebe kontrahieren können um die mit neuem Gewebe zu verschließende Fläche möglichst gering zu halten. Als Zellmarker für die Differenzierung gilt das α -SMA (α -smooth muscle actin) [39, 40].

2.2.5 Epithelisierungsphase

Nach der Verwundung der Epidermis wird die Mitoserate der Zellen der Basalzellschicht enthemmt, so dass die Keratinocyten nun vom Wundrand her das Granulationsgewebe besiedeln können (vgl. Abbildung 2.5). Dies setzt die Lösung von hemidesmosomalen Kontakten mit der Basalmembran sowie die möglichst vollständige Auffüllung des Gewebsdefekts mit Granulationsgewebe voraus. Es existieren Hinweise, dass zusätzlich auch Zellen oberhalb der Basalzellschicht über Basalzellen hinweg in das Wundareal migrieren können. Befinden sich innerhalb der Wunde Anteile intakt gebliebener Haarschäfte, können die äußeren Haarwurzelschaftzellen als zusätzliches Reservoir für epidermale Zellen dienen [16, 38, 41].

Die Migration der Keratinocyten über das Granulationsgewebe hinweg kommt mit der Ausbildung eines Monolayers zum Erliegen. Die Differenzierung des neuen epidermalen Gewebes setzt ein, wobei die Verhornung von den Wundrändern her beginnt [38].

Keratinocyten und Fibroblasten stehen während der Epithelisierungsrate über einen doppelten parakrinen Mechanismus miteinander in Kontakt. Die Ausschüttung des sehr effektiven Wachstumssignals KGF (Keratinocyte growth factor), der die Mitoserate von Keratinocyten erhöht und von Fibroblasten sezerniert wird, kann im Zellkulturexperiment durch die Keratinocyten selbst getriggert werden, indem sie mit Interleukin 1 α und 1 β die KGF-Expression in Fibroblasten anregen [42]. Die KGF-Spiegel in Wundgewebe steigen nach Aktivierung der Fibroblasten um den Faktor 100 [38].

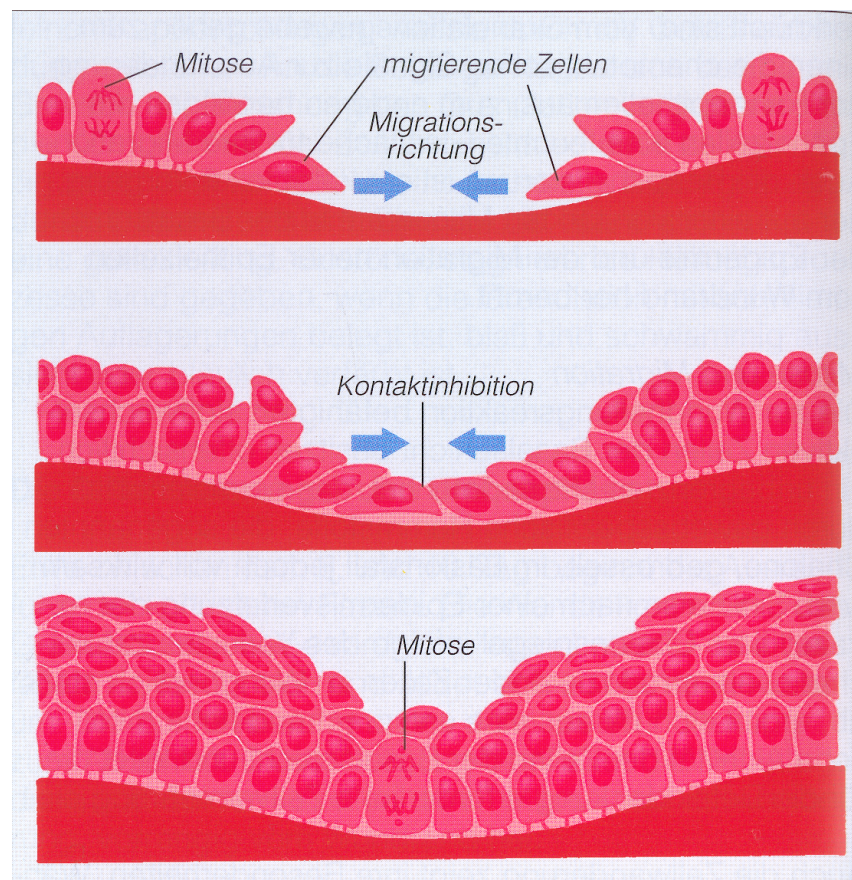


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Reepithelisierung neu gebildeten Granulationsgewebes, aus [16]

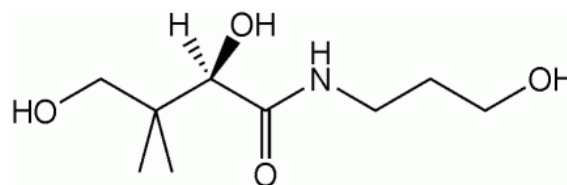


Abb. 2.6: Strukturformel von Dexpanthenol

2.3 Evaluierte Wirkstoffe und Wirkstoffzubereitungen

2.3.1 Dexpanthenol

Dexpanthenol ((+)-(R)-2,4-Dihydroxy-N-(3-hydroxypropyl)-3,3-dimethylbutyramid, vgl. Abbildung 2.6) stellt das Amid aus Pantoinsäure und β -Alanol dar. Zur Bioaktivierung wird die Alkoholfunktion des β -Alanols zur Carbonsäure oxidiert, so dass Pantothensäure, das Amid aus Pantoinsäure und β -Alanin, entsteht, die auch als Vitamin B₅ bezeichnet wird. Als Bestandteil des Coenzym A kann die Pantothensäure an einer Vielzahl von Stoffwechselreaktionen beteiligt sein; darüber hinaus ist auch der Einbau in das chemisch ähnliche Acyl-Carrier-Protein möglich. Die biologische Wirksamkeit des Dexpanthenols, wie auch der Pantothensäure, ist an die D-Konfiguration geknüpft. Dexpanthenol wurde der GRAS-Status durch die FDA zuerkannt (Generally recognized as safe); unerwünschte Arzneimittelwirkungen beschränken sich in aller Regel auf Unverträglichkeitsreaktionen in Form von Kontaktallergien [43, 44].

Dexpanthenol ist leicht in Wasser und Alkoholen löslich und zeichnet sich in gelöster Form durch eine bessere Stabilität als sein Metabolit Pantothensäure aus [45].

Es existieren Berichte, dass Dexpanthenol in Zellkulturen die Proliferation von Fibroblasten stimuliert [43]. Als Bestandteil von Coenzym A, welches den Transfer von Acetyl-Gruppen als Cofaktor enzymatischer Reaktionen bewerkstelligt, ist seine Wirkform am Metabolismus von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Proteinen beteiligt und spielt auch bei der Gluconeogenese, der Synthese von Steroidhormonen und Porphyrinen eine Rolle. Als Bestandteil des Acyl-Carrier-Proteins wirkt es an der Fettsäurebiosynthese mit. Spezifische pharmakologische Effekte der Pantothensäuregabe sind darüber hinaus nicht bekannt [45]. Durch den erhöhten Gehalt an Coenzym A nach Gabe von Dexpanthenol oder Pantothensäure steigen bei kultivierten Zellen die Glutathion- und ATP-Spiegel an [46].

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Ratten mit Dexpanthenolmangel nach Dexpanthenolgabe einen verbesserten Hautzustand aufweisen [43]; an Hybridomazellen konnte durch Pantothensäuremangel Apoptose induziert werden [47].

Auf geschädigter humaner Haut und Schleimhaut soll die topische Dexpanthenolgabe von Vorteil sein, da unter Stressbedingungen ein erhöhter Pantothen säurebedarf herrsche, der sich durch Dexpanthenol ausgleichen ließe [43]. In Übereinstimmung hiermit berichtet die Literatur von der Möglichkeit der Penetration von Dexpanthenol (im Unterschied zu Pantothen säure) in die lebenden Schichten exzidiierter Humanhaut sowie der Metabolisierung von Dexpanthenol zu Pantothen säure in der Haut [48, 49]. Als hygroskopische Substanz kann Dexpanthenol zur Verbesserung der Hautfeuchtigkeit beitragen [45].

Dexpanthenol wird seit Jahrzehnten in der topischen Behandlung von Hautverletzungen und gereizter Haut eingesetzt. In Studien konnte gezeigt werden, dass Dexpanthenol, das in zwei unterschiedlichen W/O-Emulsionen mit Konzentrationen von 1 bzw. 2,5 % formuliert war, die Feuchtigkeit der Hornschicht der Haut verbessern konnte und auch eine Reduktion des transepidermalen Wasserverlustes hervorrief. Die Effekte unterschieden sich signifikant von denjenigen der wirkstofffreien Vehikel [50].

Klinisch konnte außerdem der Nutzen von einer 5 %-igen Dexpanthenolformulierung als W/O-Creme in der Behandlung der Windeldermatitis gezeigt werden. Hierzu wurden 200 Kinder randomisiert in zwei Studien eingeschlossen. In der ersten Studie erhielten 80 Kinder in einem offenen Design entweder nur eine desinfizierende Behandlung oder zusätzlich noch eine Behandlung mit der Dexpanthenol-Creme nach jedem Windelwechsel. In der zweiten Studie wurden die übrigen 120 Kinder doppelblind entweder mit wirkstofffreiem Vehikel oder wirkstoffhaltiger Dexpanthenol-Creme behandelt. Es zeigte sich, dass in beiden Studien die Kinder in den Verumgruppen einen größeren Benefit als in den Gruppen ohne Dexpanthenolbehandlung davontrugen; ein Teil der Wirksamkeit war jedoch auf das Vehikel zurückzuführen. Bei der Vorbeugung der Windeldermatitis mit Dexpanthenol, zu deren Evaluierung eine offene dritte Studie an 54 Früh- und Neugeborenen mit der gleichen Dexpanthenol-Formulierung gegen keine prophylaktische Behandlung angesetzt wurde, zeigten sich lediglich tendenzielle Vorteile für die Dexpanthenolformulierung [44].

Es existieren weitere Berichte über klinische Anwendungen von Dexpanthenol: So erwies sich die Gabe von 200 mg Dexpanthenol als Lutschtablette als geeignet zur Prävention von Halsschmerzen in Folge einer Intubation [51]; nach Hautreizung mit Natriumlaurylsulfat kann topisches Dexpanthenol die Hautbarriereeigenschaften verbessern und antientzündlich wirken [52]. Auch zur ocularen und nasalen Applikation zum Zwecke der Behandlung von leichten Läsionen der Hornhaut, Bindehaut oder Nasenschleimhaut sind entsprechende Formulierungen zugelassen worden [53].

Neben den in der Europäischen Union gebräuchlichen topischen Dexpanthenol-Formu-

lierungen mit 5 % Wirkstoffanteil sind in den USA 2 %-ige Formulierungen üblich. Auch von der systemischen Gabe von Dexpanthenol wird berichtet; hierbei wurden täglich 250-500 mg verabreicht [45].

2.3.2 Becaplermin

Unter dem INN-Namen Becaplermin wird der rekombinante humane thrombozytäre Wachstumsfaktor der Isoform BB verstanden (rh-PDGF-BB, recombinant human platelet derived growth factor), der aus transgenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wird und ein Molekulargewicht von 24.000 D besitzt. In einer Formulierung als Hydrogel mit 0,01 % Wirkstoffgehalt ist die Substanz zur Therapie schwerer chronischer Wunden, z. B. diabetischer Ulcera, indiziert. Zusätzlich zur Arzneimitteltherapie muss ein fachgerechtes Wundmanagement erfolgen [54].

PDGF wird physiologisch von Thrombozyten, Makrophagen, dem Gefäßendothel, Zellen der glatten Muskulatur und Fibroblasten produziert. PDGF stimuliert unter anderem die Zellteilung von Fibroblasten und kann chemotaktisch auf Monocyten wirken. Sezernieren Endothelzellen PDGF, stimulieren sie hierdurch benachbarte glatte Muskelzellen parakrin zur Proliferation, die die Muskelzellen auch selbst autokrin über PDGF auslösen können [55].

Es existieren drei Isoformen von PDGF (AA, AB und BB), da PDGF ein Dimer darstellt; am Dimeraufbau sind PDGF-Ketten beteiligt, die dem Typ A oder B zugeordnet werden können. Die Assoziation zum Dimer wird über Disulfidbrücken konserviert. Der von humanen Thrombozyten gebildete PDGF verteilt sich zu 12 % auf PDGF-AA, zu 65 % auf PDGF-AB und zu 23 % auf PDGF-BB. PDGF ist stabil gegen Wärmeeinwirkung, pH-Verschiebungen und Proteasen [55]. Dies erleichtert die Anwendung von Becaplermin als Modellarzneistoff in der Zellkultur.

Die Expression von PDGF wurde auch in relevanten Konzentrationen in Keratinocyten in Kultur nachgewiesen: Hierbei wurden zwar alle drei PDGF-Isoformen (AA, AB und BB) gefunden, allerdings sezernierten die Keratinocyten nur die Isoform AA in den Medienüberstand. Eine autokrine Wirkung des PDGF-AA auf die Keratinocyten selbst erscheint unwahrscheinlich, da ein entsprechender PDGF-Rezeptor auf den Keratinocyten fehlt [56]. Auch nach Inkubation von immortalisierten Keratinocyten der Zelllinie HaCaT mit dem Nekroseinduktor Trichloressigsäure konnte eine temporäre Upregulation von mRNA der PDGF-B-Kette festgestellt werden [57].

PDGF stehen zwei physiologische Rezeptoren gegenüber, der PDGF- α - und der PDGF- β -Rezeptor. Dabei erkennt der PDGF- α -Rezeptor sämtliche PDGF-Isoformen, im Ge-

gensatz zum PDGF- β -Rezeptor, an welchem vor allem PDGF-BB agonistisch wirkt, PDGF-AB nur noch schwach aktiv ist und PDGF-AA nicht gebunden wird. Gleichzeitig sind PDGF- β -Rezeptoren wesentlich häufiger anzutreffen als die PDGF- α -Rezeptoren [55, 58]. Daraus erklärt sich die Verwendung von Becaplermin, der BB-Isoform, im Fertigarzneimittel.

Die klinische Anwendung in den oben dargestellten Indikationsgebieten stützt sich unter anderem auf eine Studie, in der multizentrisch 172 Typ-I- oder Typ-II-Diabetiker eingeschlossen waren, die über mindestens acht Wochen an Ulcerationen an den unteren Extremitäten gelitten hatten. Im Vergleich zum wirkstofffreien Vehikel zeigte sich während einer maximalen Behandlungsdauer von 20 Wochen ein signifikanter Vorteil für die Becaplermin-Behandlung. Während in beiden Studienarmen eine fachgerechte Wundpflege durchgeführt wurde, wurde auch für das reine Vehikel ein positiver Effekt aufgrund des Schaffens einer feuchten Wundumgebung vermutet [59, 60].

In einer kleineren Studie konnte am Tiermodell und auch am Menschen gezeigt werden, dass Becaplermin ohne Vorliegen einer Wundkontraktion durch die Bildung von Granulationsgewebe die Reepithelisierung von Wunden fördert und es 10-20 % schneller als in Abwesenheit von Becaplermin zum Wundverschluss kommt. Als Mechanismus postulieren die Autoren die verstärkte Proliferation von Fibroblasten; in der Folge können dann die Fibroblasten eine Migration von Keratinocyten in die Wundoberfläche initiieren, so dass Becaplermin einen mittelbaren Einfluss auf die Keratinocyten ausübt [61].

Seit eine retrospektive Studie gezeigt hat, dass Patienten mit Neoplasien unter Becaplermin-Behandlung bei Verbrauch von drei oder mehr Tuben Becaplermin-Gel ein fünffach erhöhtes Mortalitätsrisiko bezogen auf die Neoplasie im Vergleich zu nicht mit Becaplermin behandelten Patienten haben, sollte der Proliferationsstimulator bei entsprechenden Patienten nur unter strenger Indikationsstellung eingesetzt werden [62].

2.3.3 Epoetin beta

Epoetin beta stellt die rekombinante Version des humanen Erythropoetins dar, welches z. B. aus dem Urin anämischer Patienten isoliert werden kann. Epoetin beta trägt das identische Glycosilierungsmuster wie humanes Erythropoetin (vgl. Abbildung 2.7).

Erythropoetin wird physiologisch vor allem renal sezerniert in Folge hypoxischer Reize. In der Folge steigt die Zahl an zirkulierenden Erythrocyten und der Hämoglobinwert nimmt zu [63]. Den erhöhten Einbau an radioaktiv markiertem Eisen nutzt das Europäische Arzneibuch zur Wertbestimmung konzentrierter Erythropoetin-Lösung [64].

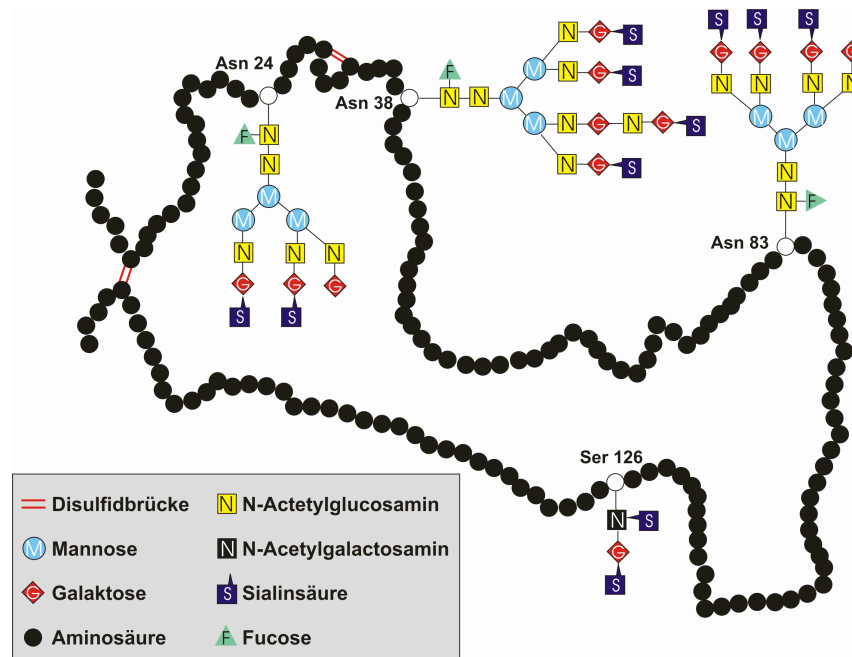


Abb. 2.7: Erythropoetin-Molekül

Aus der Feststellung, dass Erythropoetin vor allem die Erythrozytenproduktion stimuliert, leiten sich die klassischen Indikationsgebiete für Epoetin beta ab, die die Behandlung von Anämien renaler Genese oder nach Applikation einer Chemotherapie sowie die Erhöhung der Eigenblutmenge bei Eigenblutspendern einschließen [63].

Darüber hinaus existieren jedoch Berichte, die einen Nutzen von Epoetin beta in der wundheilungsfördernden Brandwundentherapie postulieren. Hierbei wurden im Tierversuch placebokontrollierte Daten erhoben, die nach Beibringung einer 6 cm² großen Brandwunde an betäubten Mäusen für eine beschleunigte Reepithelisierung, einen beschleunigten Wundverschluss und eine verbesserte Gefäßversorgung nach subcutaner Gabe von Epoetin beta sprechen. Von Relevanz für die erleichterte Wundheilung im Tiermodell könnte die vermehrte Synthese von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und NO im Wundareal als Reaktion auf die Epoetin beta-Gabe sein [65].

2.4 Zellkulturen und Zellmodelle

Die Grundlagen der Zellkultur reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück, als es Roux 1885 erstmals gelang embryonale Zellen aus Hühnereiern kurzzeitig in einer salinischen Lösung zu kultivieren. 1913 erreichte dann Carrel durch die Verwendung aseptischer Kulturtechniken eine verlängerte Kultivierungsdauer. 1952 eröffnete Gey den Zugang zu immortalisierten Zelllinien, mit denen die Subkultivierungsbeschränkungen von Primärzellen aus

Explantaten überwunden wurden [66].

2.4.1 Kultivierung von dermalen Zellen im Monolayer

Im Rahmen der Kultur humaner dermaler Zellen stehen dermale Fibroblasten bzw. Keratinocyten im Fokus des Interesses, da diese die dominierenden Zellarten in der Dermis bzw. der Epidermis der Humanhaut darstellen. Darüber hinaus spielen auch Sebozyten, die Lipide des Sebums sezernieren, sowie Melanozyten, die für die Hautpigmentierung verantwortlich sind, eine Rolle [11, 67].

2.4.1.1 Fibroblasten

Fibroblasten lassen sich leicht in Standardmedien wie DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) auf unbeschichteten Kunststoffsubstraten kultivieren und zeichnen sich durch hohe Proliferationsraten aus (siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.2). Vom Einsatz humaner immortalisierter Fibroblasten wird in der Literatur nicht berichtet. Zwar gehen primäre Fibroblasten in Entsprechung zu anderen Primärzellarten nach häufiger Subkultivierung ebenfalls in die Seneszenz über, in welcher sie ihre mitotische Aktivität einstellen, jedoch sind sie leicht zugänglich, so dass in aller Regel kein Bedarf für eine immortalisierte Zelllinie besteht. Kommerziell erhältliche Fibroblastensuspensionen sind häufig aus Neugeborenenenvorhäuten nach Beschneidungen isoliert, da diese Fibroblasten eine höhere Teilungsaktivität als adulte Zellen aufweisen [68].

2.4.1.2 Keratinocyten

Primäre humane Keratinocyten (PHK), die ähnlich wie Fibroblasten z. B. aus Neugeborenenenvorhäuten oder auch Spenderhäuten nach operativen Eingriffen isoliert werden, stellen besondere Ansprüche an die Kultivierung. So empfehlen kommerzielle Anbieter von Primärzellen die Beschichtung von Kunststoffsubstraten mit Kollagen I oder die Verwendung von serumfreien Spezialmedien, die mit rekombinanten Wachstumsfaktoren - wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) - oder bovinem Hypophysenextrakt anzureichern sind, um Anheftung und Proliferation der Keratinocyten sicherzustellen. Zusätzlich verlieren primäre Keratinocyten rasch ihre Teilungsfähigkeit, sowohl nach wenigen Passagen der Subkultivierung (5-6) als auch nach Erreichen von Konfluenz, die eine irreversible Proliferationshemmung auszulösen vermag [69, 70, 71].

Alternativ bieten sich immortalisierte Zelllinien an, die zwar z. T. mehr als 100-fach subkultiviert werden können, deren Verwendung jedoch auch Risiken in sich bergen kann:

Häufig werden Zelllinien aus entartetem Gewebe gewonnen, in denen durch Mutation die Proliferationshemmung entfallen ist. Eine andere Möglichkeit besteht in der Einbringung von Vektoren, die die gewünschte Immortalisierung herbeiführen sollen. In jedem Falle besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Zellen bereits bei Erzeugung der Zelllinie oder auch erst im Laufe der Subkultivierungen ein Genexpressionsmuster zeigen, das von dem der abzubildenden Primärzellen derartig abweicht, dass eine Übertragbarkeit von Ergebnissen, die an Zelllinien generiert worden sind, nicht immer gesichert ist. Außerdem können während langfristiger Kultivierung entdifferenzierte Mutanten entstehen, die die Zelllinie in der Fähigkeit zur Proliferation übertreffen und daher überwuchern können [68].

Mit der HaCaT-Zelllinie, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, steht allerdings eine immortalisierte Keratinocytenlinie zur Verfügung, die in ihrem Expressionsmuster dem von primären Keratinozyten entspricht, was die Autoren damit begründen, dass die Transformation spontan durch Änderung der Kultivierungsbedingungen (Temperaturerhöhung auf 38,5 °C) erreicht wurde ohne Vektoren einzusetzen. Zwar stammt die Hautspende, aus der heraus die HaCaT-Zellen generiert wurden, aus der Operation eines Melanoms, jedoch wurde peripheres, histologisch unauffälliges Material benutzt. Bekannt ist, dass im Verlaufe der Kultivierung von HaCaT-Zellen Unregelmäßigkeiten im Chromosomensatz in Form von Aneuploidie vorkommen; dies soll sich jedoch nicht auf das für die Kultivierung relevante Differenzierungsmuster der Zellen auswirken; auch konnte im Fall einer Transplantation auf Versuchstiere kein invasives Wachstum detektiert werden [72].

2.4.2 Kokultivate

Primäre Keratinocyten stellen hohe Ansprüche an die Kultivierungsmethoden; werden diese nicht angeboten, kann von einer ausreichenden Proliferation nicht ausgegangen werden. Als Lösungsansatz bieten sich neben Spezialmedien auch Kokulturen mit Fibroblasten an. Um ein Überwuchern der Keratinocyten durch die Fibroblasten zu verhindern, besteht ein Lösungsansatz darin Fibroblasten zu verwenden, die durch Einwirkung von Gammastrahlung nicht mehr zur Mitose befähigt sind, jedoch noch mit den Keratinocyten parakrin wechselwirken können. Hierzu sind in der Literatur murine 3T3-Fibroblasten erwähnt, die als „Feeder layer“ für Keratinocyten dienen [70].

In einem anderen Lösungsansatz werden durch Fibroblasten konditionierte Medien genutzt, um eine ausreichende Proliferation zu erzielen oder auch einen mehrschichtigen Epidermisaufbau mit Zelldifferenzierung zu erreichen. Dabei zeigt sich, dass einerseits Fibroblasten benötigt werden, damit die Proliferationsrate der Keratinocyten deutlich

ansteigt gegenüber einer Kultivierung in unkonditioniertem Standardmedium. Andererseits liefert die beiderseitige Interaktion zwischen Keratinocyten und Fibroblasten in einem Kokultivat oder durch Kultivierung mit einem durch beide Zellarten konditionierten Medium eine besser an die in vivo-Situation angenäherte Epidermis. Dies wird durch parakrine Mechanismen und die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren begründet; neben KGF spielt wohl auch GM-CSF (Granulocyten Macrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) eine relevante Rolle [42, 71, 73, 74].

Kokulturen aus HaCaT-Zellen mit Feeder-Layern aus 3T3-Zellen wurden als einfaches Wundheilungsmodell vorgeschlagen, indem eine Traumatisierung durch den 48-stündigen Entzug von Serum (0,1 % anstelle von 10 % Serum im Kultivierungsmedium, „serum starving“) eine Arretierung der Zellen in der G₀- / G₁-Phase des Zellzyklus hervorrief [75].

2.4.3 Organotypische Hautäquivalente

Organotypische Hautäquivalente sind in verschiedenen Ausprägungen in der Literatur beschrieben worden und zum Teil auch kommerziell erhältlich. Sie dienen verschiedensten Zwecken in Kosmetikindustrie, Pharmazie und Medizin, indem sie zum Formulierungsscreening im Sinne von Permeationsuntersuchungen [9, 10, 11, 76, 77, 78], zum Ersatz von Tierversuchen bei der Risikoeinschätzung von chemischen Substanzen [1, 79], als Transplantat nach Traumata oder operativen Eingriffen [41, 80, 81, 82, 83], oder zum Aufklären von biochemischen Signalwegen z. B. im Rahmen eines Wundheilungsmodells eingesetzt werden [84]. Auch der Versuch eines Wirkungsnachweises für Hautschutzprodukte anhand von organotypischen Hautäquivalenten ist in der Literatur aufzufinden [85, 86].

Organotypische Hautäquivalente bieten realistischere Versuchsbedingungen als die klassische zweidimensionale Zellkultur, da die Annäherung an strukturelle und funktionale Charakteristika des modellhaft nachgestellten Gewebes aufgrund von Zell-Zell-Interaktionen und dem dreidimensionalen Aufbau unter Zuhilfenahme von angepassten Kultivierungstechniken und -medien verbessert wird [84]. Zur Zeit existieren jedoch keine Hautäquivalente, die die Anatomie, die Physiologie oder die mechanische Festigkeit der unverletzten menschlichen Haut nachstellen können [87]. Auch fehlen Haarfollikel, Drüsen und Immunzellen [88].

In den Modellen kann lediglich eine Abbildung der humanen Epidermis vorgenommen werden oder es können auch kombinierte Modelle aus Dermis und Epidermis konstruiert werden. Beide Varianten sind kommerziell erhältlich; die Epidermismodelle unter-

schiedlicher Hersteller wurden in einer multizentrischen Studie validiert, um auch im regulatorischen Bereich einsetzbar zu sein [1, 79].

Als Modell für Regeneration und Wundheilung wurden bislang Hautkonstrukte genutzt, deren Regeneration nach einer Inzision histologisch und immunhistochemisch ausgewertet wurde [89, 90]. Alternativ wurden die histologische Entwicklung und die Expression von Markerproteinen nach Vereisung durch Aufsetzen eines in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallkörpers evaluiert [91].

2.5 Zelluläre Assays

2.5.1 Allgemeines

Zelluläre Assays finden z. Zt. einen breiten Einsatz in der Biotechnologie und werden genutzt, um Zustandscharakteristika eines Gewebes, eines zweidimensionalen Zellverbandes, einer Zelle oder eines zellinternen Vorganges zu ermitteln, zu überwachen und aufzuklären. Heute gebräuchliche Assays bedienen sich häufig einer Farbreaktion mit Absorption im UV-Wellenlängenbereich oder im Bereich des sichtbaren Lichtes, der Bildung und Quantifizierung eines Fluorophores oder auch der Emission biochemischen Lichtes als Lumineszenz.

Neben den im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse befindlichen Vitalitätsassays werden zellbasierte Assays auch eingesetzt um z. B. die Proteasomen-Aktivität der Zelle durch Lumineszenz [92], die Aktivität der posttranslationalen Modifizierung durch Fluoreszenz [93] oder auch Interaktionen von Arzneistoffen mit metabolisierenden Enzymen zu bestimmen. Eine Anwendungsmöglichkeit für die letztgenannte Fragestellung ist die Aktivitätsbestimmung der Monoaminoxidasen (MAO) nach Inkubation mit potentiellen MAO-Inhibitoren und Auslesung eines Lumineszenzsignals [94].

2.5.2 Vitalitätsassays

2.5.2.1 Begriffsbestimmung

Unter dem in der Literatur gebräuchlichen Begriff „Vitalität“ wird das Ausmaß der Stoffwechselaktivität und damit das Ausmaß der Lebens- oder Überlebensfähigkeit einer Zelle oder eines Gewebes verstanden. Dies kann über Mediatoren des zellulären Stoffwechsels, Stoffwechselsubstrate oder -produkte einer quantitativen Betrachtung und Verlaufskontrolle zugeführt werden.

Da in einem proliferierenden Gewebe oder Zellmonolayer die Zellzahl parallel zum Gesamtstoffumsatz ansteigt, kann unter den Bedingungen einer noch nicht eingetretenen Wachstumshemmung eine Vitalitätsmessung auch zur Zellzählung herangezogen werden. Sobald sich jedoch eine Monolayerkultur dem Stadium der Konfluenz annähert, in dem durch das zunehmende Bedecken der Anheftungsfläche und das gegenseitige Berühren der Zellen eine Teilungshemmung eintritt, werden sich Zellzahl und Zellvitalität nicht mehr parallel bewegen: Während im Stadium der Konfluenz die Zellzahl annähernd konstant bleibt, wird der Zellstoffwechselumsatz herunter reguliert, da keine mitotischen Prozesse mehr aufrecht erhalten werden müssen. Insofern darf die Zellvitalität nur unter den genannten Voraussetzungen auch als „Zahl lebensfähiger Zellen“ interpretiert werden.

Indem zytotoxische Agenzien lebensfähige Zellen eliminieren und den Stoffwechselumsatz überlebender Zellen zumindest temporär beeinträchtigen, können Vitalitätsassays auch zur Quantifizierung zytotoxischer Effekte herangezogen werden. Hierzu muss dann das Messsignal korreliert werden mit einer Referenz, die keinem zytotoxischem Einfluss unterlegen ist, sowie einer Probe, die durch Einsatz einer bekanntermaßen zum Zelltod führenden Agenzkonzentration einem maximalen zytotoxischen Effekt unterzogen wird. Werden verschiedene Konzentrationsreihen oder Einwirkzeiten eines zellschädigenden Agens eingesetzt, können Parameter wie die halbmaximale inhibitorische Konzentration ermittelt werden.

Wird die Zytotoxizität einer Substanz bestimmt, kann mit Vitalitätsassays nicht direkt aufgeklärt werden, auf welchem Wege zytotoxische Agenzien den Zelltod hervorrufen. Hierbei sind zwei Hauptwege zu unterscheiden; nämlich der unphysiologische Zelltod durch Nekrose oder der programmierte Zelltod durch Apoptose.

Apoptose

Im Falle der Apoptose existieren zwei unterschiedliche Wege, um die Apoptose einzuleiten. Den extrinsischen Weg können Zytokine wie der Tumornekrosefaktor- α initiieren, indem sie an den sogenannten Todesrezeptor auf der Zellmembran binden. Nach Assoziation von drei Rezeptor-Ligand-Komplexen zu einem Trimer entsteht auf der cytoplasmatischen Seite eine Interaktionsdomäne, die den Beginn einer Reaktionskaskade des gegenseitigen Aktivierens von proapoptotischen Proteasen zu aktiven Caspasen ermöglicht. Hierbei kommt es zunächst zur Aktivierung der Caspase 8, die dann den Zelltod über eine Caspasekaskade mit den Effektorcaspasen 3 und 7 auslöst [95].

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Einleitung der Apoptose über den intrinsischen Weg, indem Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran freigesetzt wird. Mög-

licherweise wird dies in bestimmten Signalwegen angeregt durch eine Calciumspiegelerhöhung, die im Endoplasmatischen Retikulum ihren Ursprung hat. Cytochrom C findet sich in der Folge mit dem Protein Apaf-1 und hieran aggregierenden und sich aktivierenden Caspasen zum sogenannten Apoptosom zusammen. In diesem Signalweg ist die Aktivierung von Caspase 7 und 9 besonders relevant. Für den Fall, dass nach extrinsischer Aktivierung der Apoptose die exprimierten Signalwege alleine nicht genügen um den Zelltod herbeizuführen, kann der intrinsische Weg sekundär aktiviert werden um die Bildung des Apoptosoms zu induzieren [95].

Morphologisch zeichnet sich die Apoptose durch das sogenannte „Blebbing“, die Abschnürung von cytoplasmatischen Partikeln nach Schrumpfung der Zelle und Zunahme der optischen Dichte aus. Die an Histone assoziierte DNA wird durch Endonucleasen zwischen den Histonen in Strangbruchstücke geschnitten, so dass sich nach Elektrophorese eine DNA-Leiter nachweisen lässt. Nach 1-4 Stunden ist die Apoptose abgeschlossen. Neben den morphologischen Veränderungen und dem elektrophoretischen Bild kann der Nachweis der Apoptoseinduzierung in der Zell- und Gewebeskultur über die Aktivierung von Caspasen, die sich über Fluoreszenz- oder Lumineszenzreaktionen sichtbar machen lassen, geführt werden [95, 96]. Über einen selektiven Nachweis von Caspase 8 bzw. Caspase 9 lässt sich ermitteln, ob die Apoptose über den extrinsischen oder intrinsischen Weg abgelaufen ist [97].

Nekrose

Die Nekrose stellt den unphysiologischen Zelltod als Antwort auf extrem unphysiologische Bedingungen dar, z. B. nach der Einwirkung hoher Konzentrationen von Noxen. In diesem Falle kann keine geordnete Einleitung des Zelltodes eintreten. Die nekrotische Zelle schwillt im mikroskopischen Bild an, entlässt Cytoplasma in den Extrazellulärraum und geht unter. Bei diesem ungeordneten Zelluntergang werden unter anderem proinflammatorische Cytokine freigesetzt. Unter optimalen Bedingungen in der Zellkultur nur intrazellulär anzutreffende Enzyme lassen sich nach Verlust der Membranintegrität extrazellulär nachweisen, wie z. B. die Lactatdehydrogenase (LDH). Deren extrazelluläres Vorliegen weist in der Zell- und Gewebeskultur auf nekrotische Prozesse hin, während die Bestimmung von LDH in der Labormedizin genutzt wird, um das Untergehen von Zellen in Herz oder Leber aufzuzeigen. Über die Quantifizierung von LDH-Isoenzymen ist eine Differentialdiagnose möglich. Bei der Nekrose kommt es nicht zur Aktivierung von Caspasen [98].

2.5.2.2 Vitalitätsassays auf Tetrazoliumsalzbasis

MTT-Assay

Bereits 1983 wurde von Mosmann ein Testsystem vorgeschlagen, das auf der Basis eines Tetrazoliumsalzes je nach Versuchsaufbau eine Aussage über die Proliferationsrate einer Zellkultur, Zellwachstum, Überlebensrate und über zytotoxische Effekte zuließ [99]. Die Methode fußt auf der Verstoffwechslung eines Tetrazoliumsubstrates zu einem Metaboliten, der ein vom Substrat verschiedenes Absorptionsmaximum zeigt, so dass der Test über kolorimetrische Messungen ausgewertet werden kann.

Mosmann schlägt als Substrat MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) vor. Dieses gelbe, wasserlösliche Salz kann von lebensfähigen, stoffwechselaktiven Säugerzellen unter Reduktion und Ringöffnung zu einem blau-violetten Formazan umgewandelt werden [100]. Durch die Notwendigkeit einer bis zu vierstündigen Inkubation der zellulären Systeme mit dem Tetrazoliumsalz können Vorgänge, die in kürzeren Zeitfenstern stattfinden, mit diesem Assay nicht ausreichend aufgelöst werden. Da das Endprodukt wasserunlöslich ist und z. T. intrazellulär in Kristallnadeln ausfällt, ist zur Auswertung die Zelllyse mit einem Tensid und das Auflösen des Farbstoffes in einer salzsäuren isopropanolischen Lösung erforderlich. Während das farbige Formazan in der Nähe seines Absorptionsmaximums bei 570 nm vermessen wird, absorbieren MTT und Zelltrümmer praktisch nicht. Für eine Zellzahlbestimmung mit MTT wurde eine Linearität zwischen 200 und 50.000 Zellen nachgewiesen [99].

Die Reaktion des MTT zum ringoffenen Formazan (vgl. Abbildung 2.8) geschieht unter Oxidation der Pyridinnucleotide Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH). Diese Reaktion wird von mikrosomalen Enzymen und Enzymen der äußeren mitochondrialen Membran katalysiert. Eine weitere Möglichkeit für die NADH-abhängige Reduktion ergibt sich aus in der Zellmembran lokalisierten Enzymen [101]. Die succinatabhängige Reduktion von MTT im Rahmen der Elektronentransfers der Atmungskette, der in früheren Publikationen eine große Bedeutung beigemessen wurde, trägt lediglich zu ca. 10 % zum MTT-Umsatz bei [102]. Diese Resultate lassen sich experimentell untermauern, indem trotz Inhibition von Atmungskettenenzymen mit Natriumazid, einem Inhibitor der Cytochrom-c-Oxidase, oder Rotenon, einem Inhibitor der NADH/Coenzym-Q-Oxidoreduktase der inneren mitochondrialen Membran, die MTT-Reduktion weiter ablaufen kann [102, 103].

Daraus ergibt sich, dass die MTT-Reduktion vor allem über Pyridin-Nucleotide aufrechterhalten wird, die aus der Glycolyse hervorgehen, in deren Verlauf je mol Glucose anaerob zwei mol NADH gebildet werden. Aufgrund des in aller Regel hohen Nährstoffangebotes

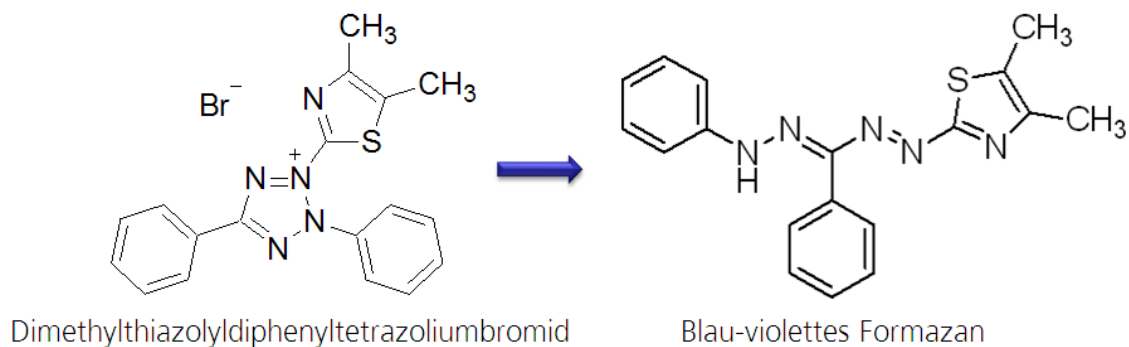


Abb. 2.8: Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zum ringoffenen Formazan

in Zellmedien werden die darin angebotenen Zucker meist nur anaerob verstoffwechselt, so dass sich der MTT-Test als geeigneter Test im Rahmen der Zell- und Gewebeskultur auszeichnet, da er einen für die Energiegewinnung maßgeblichen Weg evaluiert [68, 102].

Die Anwendung des MTT-Tests ist auch auf dreidimensionale Gewebe ausgedehnt worden [104].

Tetrazoliumsalz-Tests neuerer Generation

Neben dem MTT-Test sind weitere Tetrazoliumsalze zur Vitalitätsmessung eingeführt worden. Hierbei handelt es sich z. B. um XTT (3'-[1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzensulfonsäure-Hydrat), MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; innere Salz-bildung) und WST-1 (4-(3-4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzen-disulfonat) [105].

Diese Systeme bieten den Vorteil, dass sie nach Überführung in die reduzierte Form wasserlösliche Produkte bilden, so dass eine Aufnahme des Reaktionsproduktes mit organischen Lösemitteln vermieden werden kann. Eine Zellyse ist nicht zwingend notwendig, so dass im Rahmen des Multiplexings auch noch weitere Messvorgänge an die Vitalitätsevaluation angeschlossen werden können. Im Falle von XTT bleibt der entstehende Farbstoff allerdings nur über einige Stunden stabil [102].

Unterschiede in der Assaychemie der neueren Tetrazoliumsalze gegenüber dem klassischen MTT-Test wirken sich jedoch auch auf das Resultat des Assays aus, so dass die Ergebnisse nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können: In Anwesenheit zellulärer Systeme und deren Enzyme wird die Reduktion von XTT und WST-1 vor allem durch die Succinat-Dehydrogenase des Mitochondriums katalysiert. Zwar lassen sich beide Tetrazoliumsalze auch durch NADH und NADPH leicht und spontan reduzieren;

diese Reduktion unterbleibt jedoch in Anwesenheit mitochondrialer Enzyme. Ein weiterer Reduktionsweg, der nur in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies abläuft, wird in Anwesenheit von Zellen durch deren Superoxiddismutaseaktivität unterbunden. Im Umkehrschluss bedeutet dies auch, dass Inkompatibilitäten auftreten können, wenn Multiplexing mit Assays betrieben wird, die NADH oder NADPH beinhalten, da eine rasche Farbvertiefung auftreten kann. Auch die Anwesenheit anderer reduzierender Stoffe im zu vermessenden System, die zum Beispiel durch das Zellmedium eingetragen werden, können die Tetrazoliumsalze reduzieren, so dass zu hohe Vitalitätswerte vorgetauscht werden. Hier kommen Ascorbinsäure, Cystein und Glutathion als Störsubstanzen in Betracht. Vorteilhaft hingegen ist jedoch die bereits nach Minuten einsetzende Farbentwicklung bei der Verwendung von neueren Tetrazoliumsalzen [102].

MTS, das auch als Owens Reagenz bezeichnet wird, stellt eine Weiterentwicklung von MTT dar, die auf gleichem Wege wie MTT reduziert wird, jedoch auch den Vorteil des Multiplexings und der Wasserlöslichkeit der reduzierten Form enthält, wie dies auch bei XTT und WST-1 verwirklicht ist. Die Inkubationszeit ist mit der des klassischen MTT-Tests vergleichbar [106].

2.5.2.3 Vitalitätsassays auf Resazurin-Basis

Resazurin stellt einen Redoxfarbstoff dar, der durch zelluläre Redoxenzyme in Anwesenheit von NADH oder auch anderen Reduktionsäquivalenten zu Resorufin umgesetzt werden kann (vgl. Abbildung 2.9). Als Ort der Reduktion kommen mitochondriale, mikrosomale und cytosolische Enzymsysteme in Betracht. Die Reduktion verläuft intrazellulär und wird nicht durch Zellkulturüberstände beeinflusst [107, 108].

Die Menge an gebildetem Resorufin kann ähnlich wie bei den Tetrazoliumsalzassays über eine kolorimetrische Bestimmung quantifiziert werden; allerdings überlappen sich die Absorptionsspektren des Redoxpaares Resazurin / Resorufin (vgl. Abbildung 2.10). Eine Auswertung ist möglich durch Absorptionsmessungen bei 570 nm für Resorufin und 600 nm für Resazurin, sofern durch entsprechende Kalkulationen die Überlappung berücksichtigt werden kann [106, 109].

Vorteilhafter ist die Bestimmung jedoch fluorimetrisch durchzuführen, da nur das pinkfarbene Resorufin, jedoch nicht das blaue Resazurin, Fluoreszenz zeigt und auf diese Weise das Überlappungsproblem der Absorptionsmessung umgangen werden kann. Für das Wellenlängenpaar 540 nm (Excitation) und 600 nm (Emission) wurde eine erhöhte Sensitivität des Tests im Vergleich zur kolorimetrischen Bestimmung postuliert [106, 109]. Der Redoxfarbstoff kann für Untersuchungen zur Vitalität, Proliferation und Zytotoxizität eingesetzt werden und muss ähnlich lange wie MTT inkubiert werden; am Beispiel

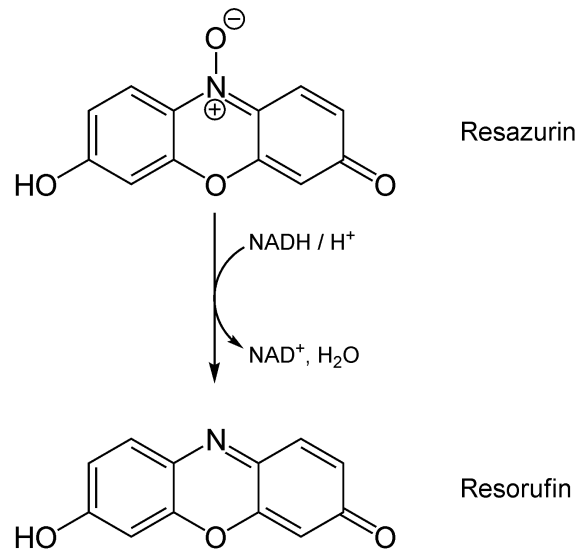


Abb. 2.9: Reduktion von Resazurin zu Resorufin

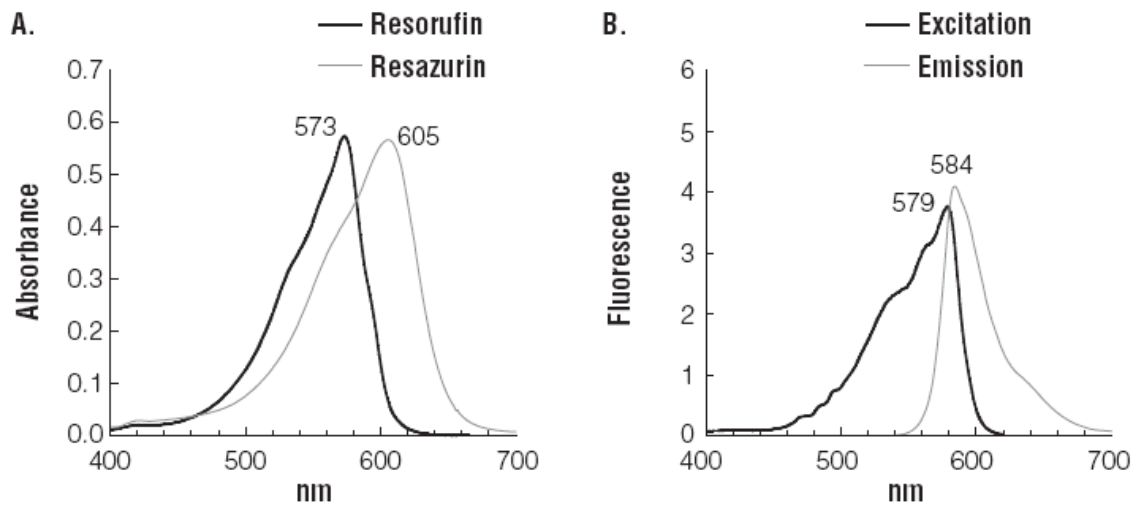


Abb. 2.10: Absorptionsspektren für Resorufin und Resazurin (A) sowie Anregungs- und Fluoreszenzspektrum für Resorufin (B); Aufnahme in Gegenwart von serumhaltigem Zellkulturmedium. Quelle: [109]

von 3T3-Fibroblasten ergab sich laut Literatur ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Messsignal im Bereich von 100 - 20.000 Zellen, so dass der Assay im Vergleich zum MTT-Test für eher geringere Zellzahlen geeignet ist und durch ein wasserlösliches Reaktionsprodukt zusätzlich dem Multiplexing zugänglich ist [110].

2.5.2.4 Vitalitätsassays auf Biolumineszenzbasis

Eine erhöhte Sensitivität im Vergleich mit fluorimetrischen oder kolorimetrischen Assays lässt sich erzielen, indem die Luciferin-Luciferase-Reaktion ausgenutzt wird, um z. B. den ATP-Spiegel in der Zelle zu quantifizieren. Hierzu wird eine im Säugerorganismus nicht vorkommende enzymatische Reaktion genutzt und über die Assaychemie eingebracht, in deren Verlauf aufgrund eines exothermen Reaktionsmechanismus Lichtquanten emittiert werden und somit Biolumineszenz erzeugt wird. Benötigt wird einerseits als Enzymkomponente eine Luciferase, die z. B. der Feuerfliege (*Photinus pyralis*), einer besonders stark lumineszierenden Gattung, entstammt und rekombinant gewonnen werden kann [111, 112]. Andererseits wird ein Photonen emittierendes Substrat eingesetzt, das Luciferin, welches nach Bindung von ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat intermediär Luciferyl-AMP bildet, das mit Sauerstoff zu energiereichem Oxyluciferin weiter reagiert. Dieses relaxiert unter Aussendung von Photonen im Wellenlängenbereich von ca. 560 nm (gelblich-grünlich). Die Verwendung von Luciferasen anderer Gattungen ist ebenfalls möglich; diese emittieren das Lumineszenzlicht jedoch in anderen Wellenlängenbereichen. So lumineszieren die Gemeine Seefeder (*Renilla reniformis*) und *Aequorea victoria*, eine Quallenart, im Bereich des blauen sichtbaren Lichts [113, 114].

Ähnlich wie bei fluorimetrischen Bestimmungsmethoden werden emittierte Lichtquanten mittels Photomultiplier detektiert und quantifiziert bzw. über einen vorgewählten Zeitraum integriert. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird bei Lumineszenzreaktionen der angeregte Zustand in einem Molekül, aus dem heraus die Photonenemission erfolgen kann, nicht durch die Einstrahlung von Licht auf einer excitatorischen Wellenlänge, sondern durch eine chemische Reaktion erreicht (vgl. Abbildung 2.11). Man spricht von Chemilumineszenz, sofern die Lichtemission nicht thermisch angeregt wurde. Biolumineszenz ist ein Spezialfall der Chemilumineszenz; sie findet jedoch enzymkatalysiert statt. Während Fluoreszenzassays üblicherweise lichtintensiver als Lumineszenzassays erscheinen und daher breit eingesetzt werden, zeichnen sich Lumineszenzassays durch das Fehlen störenden Streulichts aus, da keine Anregungsstrahlung benötigt wird [113, 115].

Lumineszenzassays zur Quantifizierung von ATP-Spiegeln in Zellen sind robust gegenüber der Einwirkung von Tensiden, die benötigt werden, um Zellen aufzuschließen, und gegenüber ATPase-Inhibitoren. Die Sensitivität der Tests wird in der Literatur als den

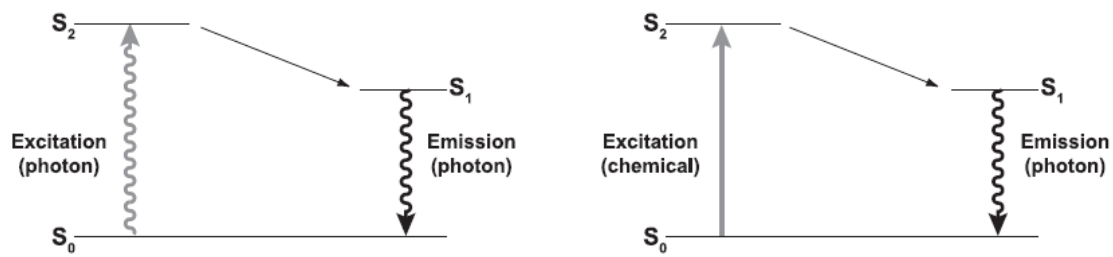


Abb. 2.11: Unterschiede zwischen Fluoreszenz (links) und Lumineszenz (rechts); S_0 : Grundzustand, S_1 : Anregungszustand nach strahlungslosem Schwingungsübergang, S_2 : Anregungszustand [113, 116].

Tetrazoliumassays überlegen beurteilt, so dass unter optimalen Bedingungen zwischen 10 und 50.000 Zellen ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lumineszenzsignal bestehen kann. Resultate aus MTT-Versuchen ließen sich nach Literaturangaben mit Lumineszenzassays reproduzieren. Da ATP als wichtigster Energieträger des Stoffwechsels direkt quantifiziert werden kann, können entsprechende Assays zur Ermittlung der Zellproliferation, der Zellvitalität sowie der Toxizität von Substanzen herangezogen werden; hierbei ist aufgrund der kurzen Inkubationsdauer im Minutenbereich auch eine Auflösung und Erfassung schnell ablaufender Prozesse und Veränderungen in der Zelle möglich [106, 113, 117, 118, 119, 120].

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Dexpanthenol

Bei dem verwendeten Dexpanthenol Ph. Eur. handelte es sich um ein Muster, das von der Firma BASF (D-Ludwigshafen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden war. In den hier beschriebenen Versuchen kam es in Form einer jeweils frisch hergestellten und sterilfiltrierten 10 %-igen Stammlösung in bidestilliertem Wasser zum Einsatz.

3.1.2 Verwendete Fertigarzneimittel

3.1.2.1 Regranex

Regranex (Janssen-Cilag NV, B-Beerse) enthält den rekombinanten thrombozytären Wachstumsfaktor Becaplermin in einer Konzentration von 0,01 % und wird in Form eines sterilen, konservierten Hydrogels in den Handel gebracht. Als Gelbildner fungiert Carmellose-Natrium, während die Konservierung des Mehrdosenbehältnisses durch den herstellerseitigen Zusatz von Methyl- und Propylparaben sowie von m-Kresol gewährleistet wird, so dass eine Verwendung des Gels noch sechs Wochen nach Anbruch möglich ist. Die bei 2-8 °C aufzubewahrende Zubereitung diente im Rahmen dieser Arbeit als Positivkontrolle einer wundheilungsfördernden Zubereitung.

3.1.2.2 NeoRecormon

Das gentechnisch erzeugte Epoetin beta, der wirksame Bestandteil von NeoRecormon (Roche Ltd., UK-Welwyn Garden City), wird in verschiedenen parenteral zu applizieren-

den Handelsformen vermarktet. Neben Fertigspritzen und Injektionslösungen in Mehrdosenbehältnissen („Multidose“) wird NeoRecormon auch in Zweikammerpatronen angeboten, die ein wirkstoffhaltiges Lyophilisat sowie konserviertes Lösungsmittel enthalten. Unmittelbar vor dem Anbruch der Patrone rekonstituiert der Anwender das Lyophilisat durch Einsetzen in den dazugehörigen Applikator, den RecoPen. Da mit diesem Applikationssystem eine exakte Dosierung vergleichsweise kleiner Mengen von Epoetin beta (ab 250 IE) möglich ist und die rekonstituierte Lösung über 4 Wochen stabil bleibt, wurde dieses System ausgewählt, um einen möglichen Einfluss des Epoetins auf die Gewebsregeneration *in vitro* zu evaluieren.

3.2 Methoden

3.2.1 Humane Zellkulturen

3.2.1.1 Humane dermale Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten (HDF) wurden nach der Isolierung aus Neugeborenenhauten von der Firma Cascade (UK-Mansfield) bezogen und als Primärzellen eingesetzt. Nach initialer Subkultivierung der in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden für die folgenden Untersuchungen die Passagen 2-9 verwendet. Als Primärzellen gingen die Fibroblasten nach ca. 13-17 Passagen in die Seneszenz über, d. h. eine weitere Proliferation war unter den gewählten Kulturbedingungen nicht hervorrufbar. In der Monolayerkultivierung wurde als Wachstumsmedium Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) genutzt, welches 10 % fötales Kälberserum und 2 mM L-Glutamin sowie Penicillin G (100 IE/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml) und Amphotericin B (0,25 µg/ml) enthielt.

3.2.1.2 Primäre humane Keratinocyten

Unter serumfreien Bedingungen wurden primäre humane Keratinocyten (PHK, Invitrogen, D-Karlsruhe) in Kultur gehalten. Hierzu diente ein chemisch definiertes Medium als Wachstumssubstrat (K-SFM, Keratinocyte Serum Free Medium), dem boviner Hypophysenextrakt, rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor (alle Invitrogen, D-Karlsruhe) und Gentamicin (PAA, A-Pasching) zugesetzt wurden. Bereits nach sechs Subkultivierungen war ein Erreichen der Seneszenz feststellbar.

3.2.1.3 HaCaT-Zelllinie

Die HaCaT-Zelllinie (**h**uman **a**dult keratinocytes, low **c**alcium conditions, elevated **t**emperature) besteht aus Keratinocyten humanen Ursprungs, die unter den im Akronym bezeichneten Bedingungen spontan zu einer immortalisierten Zelllinie transformierten. Diese Zellen wurden von Prof. Dr. N. E. Fusenig vom Deutschen Krebsforschungszentrum (D-Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Laut Literaturangaben weisen sie hohe Proliferationsraten auf und befinden sich mit ihrem Expressionsmuster dicht an nicht transformierten Keratinocyten. Als Wachstumsmedium wurde ebenfalls supplementiertes DMEM verwendet (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden die Passagen 57-90 eingesetzt. In Übereinstimmung mit den Erwartungen an eine immortalisierte Zelllinie war auch nach Erreichen der Passage 90 kein Übergang in die Seneszenz feststellbar.

3.2.2 Monolayerkultivierung

Die beschriebenen Zellarten wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 100 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ in Kulturflaschen mit 25 oder 75 cm² Wachstumsfläche submers und adhärent kultiviert [68]. Der Medienwechsel erfolgte drei mal wöchentlich. Im Falle serumhaltig kultivierter Zellen erfolgte eine Passagierung nach Besiedelung von ca. 75-100 % der Wachstumsfläche, bei serumfrei kultivierten Zellen im Bereich von 60-80 % Konfluenz, um eine irreversible Wachstumshemmung zu vermeiden.

Zur Passagierung wurde das Wachstumsmedium abgenommen, mit salinischem Phosphatpuffer (PBS) gewaschen und mit EDTA-Lösung 5-10 min lang inkubiert. Die Zugabe der EDTA-Lösung war im Falle der Subkultivierung von humanen dermalen Fibroblasten nicht erforderlich. Im Anschluss wurden die Zellen durch die Zugabe einer Trypsinlösung von der Kulturflasche abgelöst. Die Zugabe von DMEM Wachstumsmedium konnte für die HDF- und HaCaT-Zellen zum Beenden des Trypsinisierungsprozesses genutzt werden, da das im Medium enthaltene Kälberserum eine Antitrypsinaktivität aufweist [121]. Um serumfrei kultivierte PHK-Zellen nicht mit Serum in Kontakt bringen zu müssen, wurde hier durch Zugabe einer Trypsininhibitorlösung, die aus Sojabohnen gewonnen wurde (Invitrogen, D-Karlsruhe), die Reaktion abgestoppt.

Vor der erneuten Aussaat der subpassagierten Zellen wurden evtl. noch vorhandene Zellverbände durch kräftiges Auf- und Abpipettieren dispergiert und die entstehenden Zellsuspensionen nach 20-facher Verdünnung mit einem Coulter Counter Z2 (Beckman, USA-Fullerton) gezählt. Im entsprechenden Wachstumsmedium suspendiert wurden die Zellen anschließend wieder in Kulturflaschen eingesät, wobei eine Zelldichte von

$6.000 \cdot \text{cm}^{-2}$ gewählt wurde.

3.2.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden frisch subpassagierte Zellen abzentrifugiert und im zugehörigen Wachstumsmedium, das mit 20 % Dimethylsulfoxid als Kryoprotektor supplementiert war, resuspendiert. Ein Aliquot dieser Suspension, das 1 Million Zellen entsprach, wurde in Kryokonservierungsröhrchen überführt und für ca. 2 h in der Gasphase über siedendem Stickstoff abgekühlt. Im Anschluss konnte das Kryoröhrchen in den flüssigen Stickstoff abgesenkt werden.

Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen rasch auf 37 °C erwärmt. Die Suspension wurde dann in Kulturflaschen, die DMSO-freies Wachstumsmedium enthielten, einpipettiert. Das weitere Vorgehen bei der Kultivierung war identisch zu den in Abschnitt 3.2.2 gemachten Angaben.

3.2.4 Proliferationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Generationszeit der besprochenen Zellarten wurden Proliferationsuntersuchungen durchgeführt, indem je 10.000 Zellen / cm^2 in jede Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte (TPP, CH-Trasadingen) aliquotiert wurden. Für jede untersuchte Zellart bzw. Kultivierungsvariante wurde eine derartige Platte angesetzt. Während eines Zeitraums von 14 Tagen wurde an 8 Tagen die Zellzahl in jeweils drei Wells einer Platte nach Trypsinisieren durch Zählen mit dem Coulter Counter Z2 festgestellt. Aus der exponentiellen Anstiegsphase konnte die Verdopplungszeit berechnet werden.

Nachdem im Verlauf längerfristiger Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt worden war, dass Zellen aus der HaCaT-Zelllinie, die in größeren Mengen zur Kultivierung der organotypischen Hautäquivalente benötigt wurden, sich nur noch mit einer geringeren Proliferationsrate teilten als ursprünglich durch eigene Versuche und frühere Arbeiten [8] ermittelt worden war, wurde durch einen vollfaktoriellen Versuchsplan der Einfluss dreier möglicher Faktoren auf die Zellteilungsrate untersucht: Einfluss der zur Kultivierung verwendeten Charge von fötalem Kälberserum, Einfluss der Inkubationsdauer mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) vor der Passagierung und der Einfluss der Verwendung von EDTA-Lösungen verschiedener Hersteller. Zusammen mit zwei zusätzlichen Versuchen für die Passagierung ohne Zuhilfenahme von EDTA ergaben sich $2^3 + 2 = 10$ Versuche, die in der Tabelle 3.1 beschrieben sind. Diese Versuche wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen nach Kultivierung in dem in Tabelle 3.1 be-

| Lfd. Nr. | Serumcharge | EDTA-Hersteller | Inkubationsdauer [min] |
|----------|-------------|-----------------|------------------------|
| 1 | R | M | 10 |
| 2 | F | M | 10 |
| 3 | R | B | 10 |
| 4 | F | B | 10 |
| 5 | R | M | 5 |
| 6 | F | M | 5 |
| 7 | R | B | 5 |
| 8 | F | B | 5 |
| 9 | R | - | - |
| 10 | F | - | - |

Tab. 3.1: Vollfaktorieller Versuchsplan; Ready-Mix-Fertigmedium mit 10 % FCS, A-Grödig (R); Biochrom-FCS, 10 %, D-Berlin (F); EDTA-Reagenz von MP, D-Eschwege (M); Biochrom-EDTA (B)

schriebenen Medium und Passagierung unter den dort genannten Bedingungen analog zu der Vorgehensweise in Absatz 1 dieses Abschnitts durchgeführt.

Die Auswahl der Faktoren basierte auf der Identifizierung von Veränderungen unmittelbar vor dem Abfall der Effizienz der in Kultur gehaltenen HaCaT-Zellen. Das Vorliegen von Infektionen, auch von Mykoplasmenbefall, war ausgeschlossen worden.

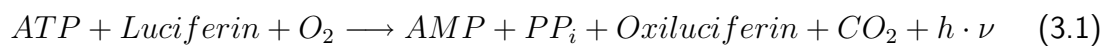
Unter der Annahme, dass Interaktionen zwischen zwei oder sogar allen drei der geprüften Faktoren unwahrscheinlich waren, konnte die Signifikanz der Haupteffekte bestimmt werden, da dann die Interaktionseffekte als zufällige Schwankungen betrachtet werden konnten, so dass sich die Standardabweichung für den Versuchsplan bestimmen ließ. Haupteffekte wurden dann als statistisch signifikant befunden, wenn diese mindestens dreifach größer waren als der für die Standardabweichung ermittelte Wert.

3.2.5 Osmolalitätsmessungen

An einem Halbmikroosmometer der Firma Knauer (D-Berlin) wurden Messungen der Osmolalität von Zellkulturmedien über die Gefrierpunktserniedrigung durchgeführt, nachdem eine Kalibrierung des Messgerätes mit bidestilliertem Wasser sowie einer Natriumchlorid-Referenzlösung (400 mosmol/kg) entsprechend den Herstellerangaben erfolgt war. Die Osmolalitätsmessungen der zu bestimmenden Zellkulturmedien wurden jeweils als Vierfachbestimmung ausgeführt.

3.2.6 Identifizierung von Mykoplasmeninfektionen

Zur Erkennung von aufgetretenen Infektionen mit Mykoplasmen wurden die in Monolayerkultur gehaltenen Zellarten mindestens alle zwei Monate untersucht. Der hierzu verwendete zweischrittige MycoAlert Assay (Lonza, B-Verviers) beruht auf der Reaktion von Mykoplasmenenzymen mit Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP). Im ersten Schritt wird die Ausgangskonzentration an ATP im Medienüberstand kultivierter Monolayer bestimmt. Hierzu macht man sich die Luciferin-Luciferase-Reaktion zu nutze, die in Anwesenheit von Luciferase und Magnesiumionen gemäß Gleichung 3.1 Photonen emittiert.



Im Anschluss werden die ggf. im Medienüberstand befindlichen Mykoplasmen durch die Assaychemie lysiert. Freiwerdende mykoplasmale Enzyme reagieren mit ADP zu ATP, welches in einer zweiten Lumineszenzmessung erneut bestimmt wird. Liegt die im zweiten Schritt gemessene ATP-Konzentration auf dem Niveau der ersten Messung, kann von der Abwesenheit von Mykoplasmen ausgegangen werden. Ein Ansteigen der gemessenen ATP-Konzentration hingegen deutet auf ein Vorhandensein einer mykoplasmalen Kontamination hin.

In diesem Falle wurden die positiv getesteten Kulturen entweder verworfen und durch eine kryokonservierte Kultur ersetzt oder einer antimykoplasmalen Therapie unterzogen. In beiden Fällen schloss sich ein erneuter Testzyklus an, um sich von der Abwesenheit einer Kontamination zu überzeugen.

3.2.7 Kultivierung organotypischer Hautkonstrukte

Zum Aufbau der organotypischen Hautmodelle (artificial skin constructs, ASC) wurde die in der Literatur beschriebene Methode [10, 11] modifiziert. Hierdurch konnte neben den bereits beschriebenen Hautkonstrukten auch eine in der Flächenausdehnung kleinere Varietät zugänglich gemacht werden, die aufgrund der geringeren Masse und des geringeren Volumens vorteilhafter in zellulären Assays eingesetzt werden konnte.

In einem ersten Schritt wurden 300.000 frisch passagierte Fibroblasten in einer Gelvormischung suspendiert, die aus 2,2 ml zehnfach konzentriertem MEM (Minimal Essential Medium, Biochrom, D-Berlin), 0,2 ml L-Glutamin (Gibco, D-München), 0,7 ml

Natriumhydrogencarbonatlösung (71,2 mg/ml, Sigma, D-Deisenhofen) und 2,5 ml fötalem Kälberserum (Gibco, D-München) bestand. Diese alkalische Zellsuspension wurde rasch mit 19 ml einer essigsauren Kollagenlösung (2 mg/ml Kollagen, gelöst in 0,05 %iger Essigsäure) vermischt, so dass ein neutraler pH resultierte. Bevor die Gelbildung des Kollagens einsetzte, die durch die Neutralisierung des pH-Wertes angestoßen wurde, erfolgte das Ausgießen der entstandenen Fibroblastensuspension in Transwellplatten auf Polycarbonatmembranen (Costar-Corning, NL-Amsterdam). Im Falle der Herstellung in Kulturplatten mit sechs Transwelleinsätzen wurden jeweils 4 ml Suspension in jedes Transwell eingefüllt, so dass sich aus der oben dargestellten Rezeptur sechs Hautkonstrukte anfertigen ließen. Alternativ konnten miniaturisierte Hautkonstrukte (mASC) angefertigt werden, indem jeweils 1 ml in jedes Transwell einer Kulturplatte mit zwölf Einsätzen eingefüllt wurden, so dass die Gießsuspension nach der genannten Rezeptur für 24 Hautkonstrukte ausreichte.

Nach der abgeschlossenen Gelierung wurde das entstandene Dermisäquivalent durch einen sterilisierten Spatel von der Transwellwand abgelöst und für eine Woche submers in DMEM-Wachstumsmedium (siehe Abschnitt 3.2.1.1) kultiviert. Während dieser Kultivierungsperiode, in der das Medium nicht gewechselt wurde, erfolgte aufgrund der metabolischen Aktivität der Fibroblasten eine Kontraktion des Dermisäquivalentes. Auch im Anschluss an die erste Kultivierungswoche war eine weitere Kontraktion feststellbar; allerdings fand der überwiegende Hauptanteil der Kontraktion in der ersten Kultivierungswoche statt.

Im zweiten Schritt wurden Keratinocyten der HaCaT-Zelllinie unmittelbar nach der Passagierung auf die kontrahierten Dermisäquivalente aufgesät, um den Aufbau einer epidermalen Struktur nachzuvollziehen. Hierzu wurden je Konstrukt 300.000 bzw. 75.000 HaCaT-Zellen für ein ASC bzw. für ein mASC nach Abzentrifugieren in 50 µl bzw. 10-20 µl DMEM-Wachstumsmedium aufgenommen, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf die flache Oberseite des kontrahierten Kollagengels gegeben, nachdem dieses von dem umgebenden Kultivierungsmedium befreit worden war. Nach einer zweistündigen Inkubationsphase ohne Medium bei 37 °C und 5 % CO₂, die der erleichterten Anheftung der Zellen an die Kollagenunterlage und einem Vermindern von Zellabschwemmung ins Medium diente, wurde wieder DMEM-Wachstumsmedium aufgegeben, welches im Zeitraum von einer Woche noch zwei Mal gewechselt wurde, da durch die vergleichsweise große Zahl proliferierender HaCaT-Zellen ein erhöhter Substratbedarf feststellbar war.

In der dritten Kultivierungsphase, die über 14 Tage angesetzt war, wurde durch ein Anheben der Hautkonstrukte an die Luft-Medium-Grenze (Air-Liquid-Interface, ALI) ein Differenzierungsreiz gesetzt, der die HaCaT-Zellen des Epidermisäquivalentes zu einer Verhornung anregen sollte, da die Nährstoffversorgung nun nur noch durch Diffusion

| Bestandteil | Volumen bzw. Konzentration | Bestandteil | Volumen bzw. Konzentration |
|------------------------------------|----------------------------|----------------|----------------------------|
| DMEM (ohne Glucose und L-Glutamin) | 375 ml | Transferrin | 5 µg/ml |
| Ham's F12 | 125 ml | Triiodthyronin | 13,5 pg/ml |
| Fötales Kälberserum | 10 ml | Selenige Säure | 6,8 ng/ml |
| Hydrocortison | 0,4 µg/ml | Adenin | 24,3 mg/ml |
| Ethanolamin | 6,1 µg/ml | $CaCl_2$ | 0,2 mg/ml |
| Phosphoryl-ethanolamin | 14,1 µg/ml | Penicillin G | 100 U/ml |
| Insulin | 5 µg/ml | Streptomycin | 0,1 mg/ml |
| | | Amphotericin B | 0,25 µg/ml |

Tab. 3.2: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums MSBM 2 %

der Medienbestandteile durch das Dermisäquivalent hindurch möglich war. Hierbei war eine Anreicherung des Mediums mit Botenstoffen der inkorporierten Fibroblasten intendiert, die parakrin auf die HaCaT-Zellen einwirken konnten. Technisch wurde dies durch eine Anhebung der Transwelleinsätze mit einer zwischen Transwellplatte und Einsätze zu legenden Metallscheibe erreicht, so dass dem Zellmetabolismus angemessen große Medienmengen unterhalb der Transwellmembran einpipettiert werden konnten.

Weiterhin wurde zeitgleich zum Anheben der Hautkonstrukte ein Medienwechsel vom DMEM-Wachstumsmedium auf ein Differenzierungsmedium vorgenommen, um die Ausbildung einer verhornenden Epidermis zusätzlich zu befördern. Hierzu wurde MSBM 2 % verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.2 angegeben ist und vornehmlich über einen erhöhten Calciumspiegel sowie einen geringeren Serumanteil antiproliferativ und differenzierungsfördernd wirkte.

Im Anschluss an die insgesamt vierwöchige Kultivierung konnten die dreidimensionalen Hautkonstrukte der weiteren Verwendung zugeführt werden. Einen schematischen Überblick über die Schritte der Kultivierung liefert die Abbildung 3.1; Tabelle 3.3 fasst die Charakteristika der beiden verschieden großen Hautkonstruktvarianten zusammen.

3.2.8 Charakterisierung organotypischer Hautkonstrukte

3.2.8.1 Histologische Charakterisierung

Zur histologischen Charakterisierung wurden ausgewählte Hautkonstrukte zunächst bei 2-8 °C in einer 4 %-igen wässrigen Formaldehydlösung, die neutral phosphatgepuffert war

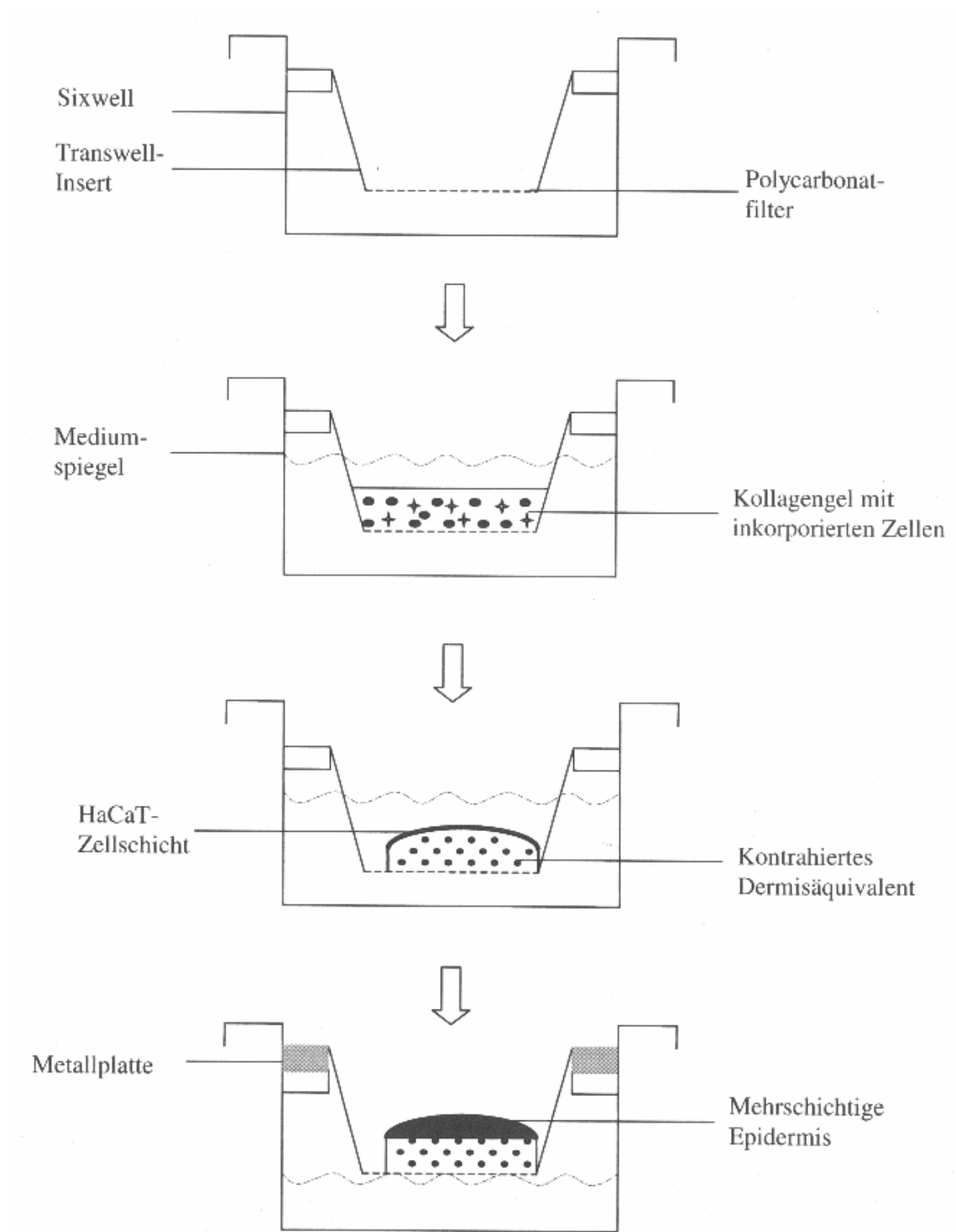


Abb. 3.1: Abfolge der Kultivierungsphasen eines Hautkonstruktes (Quelle: [11])

| | ASC | mASC |
|--------------------------------------|--|--|
| Kultivierung im Transwell | 6 / Platte | 12 / Platte |
| Kultivierungsfläche Transwelleinsatz | 4,67 cm ² / Transwell | 1,12 cm ² / Transwell |
| Gießvolumen Fibroblastensuspension | 4 ml | 1 ml |
| Zahl der eingesäten Fibroblasten | 50.000 / ASC | 12.500 / mASC |
| Zahl der aufgesäten HaCaT-Zellen | 300.000 / ASC | 75.000 / mASC |
| Volumen DMEM-Wachstumsmedium | 3 ml unterhalb und 2 ml oberhalb der Polycarbonatmembran | 1,5 ml unterhalb und 0,5 ml oberhalb der Polycarbonatmembran |
| Volumen MSBM-Differenzierungsmedium | 3 ml unterhalb der Polycarbonatmembran | 1,25 ml unterhalb der Polycarbonatmembran |
| Einsatzgebiete | Histologie und Metabolisierungsversuche | Zellassays |

Tab. 3.3: Spezifikation der beiden Hautkonstruktvarianten

(Roth, D-Karlsruhe), für 24 Stunden fixiert. Im Anschluss fand eine Dehydratisierung der Hautkonstrukte statt, indem man die Konstrukte jeweils 30 min lang in Ethanol-Wasser-Mischungen aufsteigenden Ethanolgehaltes inkubierte (30 %, 50 %, 70 % und 90 %) und abschließend drei mal über 30 min mit Ethanol 96 % (V/V) behandelte. Als Einbettungsmaterial wurde das kalt polymerisierbare Glycolmethacrylat Technovit 7100 ausgewählt (Heraeus-Kulzer, D-Hanau; [122, 123]); die Polymerinfiltration sowie die Polymerisierung und anschließende Aufblockung des Kunststoffes wurden entsprechend der Herstelleranweisung ausgeführt.

Von den ausgehärteten Kunststoffblöcken wurden auf einem Microtom (HM355S, Microm GmbH, D-Walldorf) Schnitte mit einer Dicke von jeweils 4 μm angefertigt, die anschließend mit Toluidinblau angefärbt, mit Leitungswasser gebläut und zur besseren Kontrastierung mit Ethanol-Wasser-Gemischen partiell entfärbt wurden [124]. Die fertigen Schnitte konnten nach Eindecken mit Eukitt (Fluka, D-Seelze) im Lichtmikroskop (DMLM, Leica Microsysteme, D-Wetzlar) betrachtet und fotografiert werden.

3.2.8.2 Permeationsuntersuchungen

Die kultivierten Hautkonstrukte wurden exemplarisch einer Permeationsuntersuchung mit Ibuprofen aus Ibutop-Creme (Deutsche Chefaro Pharma, D-Waltrop) unterzogen, um im Sinne einer Qualitätskontrolle die Vergleichbarkeit der hier verwendeten Konstrukte hinsichtlich des Parameters „Ausbildung einer Permeabilitätsbarriere“ mit den in Vorgängerarbeiten charakterisierten Konstrukten zu untersuchen [8, 11].

Die für die Permeationsuntersuchungen ausgewählte Creme enthielt 5 % Ibuprofensäure in einer konservierten Öl-in-Wasser-Emulsion [125]. Diese wurde in die Donorkompartimente von 12 modifizierten Franzzellen eingefüllt, deren Einsatz für Permeationsexperimente anerkannt ist ([10, 126, 127], siehe Abbildung 3.2). Die Volumina der Akzeptorkompartimente bewegten sich in einem Bereich von 5,90 bis 7,82 cm^3 ; die durch die Bauart vorgegebenen Permeationsflächen lagen zwischen 0,048 und 0,145 cm^2 , wobei die individuell unterschiedlichen Dimensionen in der späteren Ergebnisberechnung Berücksichtigung fanden. Zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment, deren Schliffflächen zur Abdichtung mit Baysilone-Paste (GE Bayer Silicones, D-Leverkusen) bestrichen waren, befand sich das Hautkonstrukt, welches vor dem Einsatz visuell auf Beschädigungen geprüft worden war. Als stützende Unterlage wurde das Hautkonstrukt auf einem Isopore-Filter (Porengröße: 5 mm, Millipore, Eschborn) eingebracht, der kein Diffusionshindernis für den Arzneistoff darstellte. Nach dem Zusammenbau der Zelle konnte das Akzeptormedium, welches salinischen Phosphatpuffer darstellte, luftblasenfrei eingefüllt werden und unter Zuhilfenahme eines Wasserbades sowie eines Magnetkerns (150 upm)

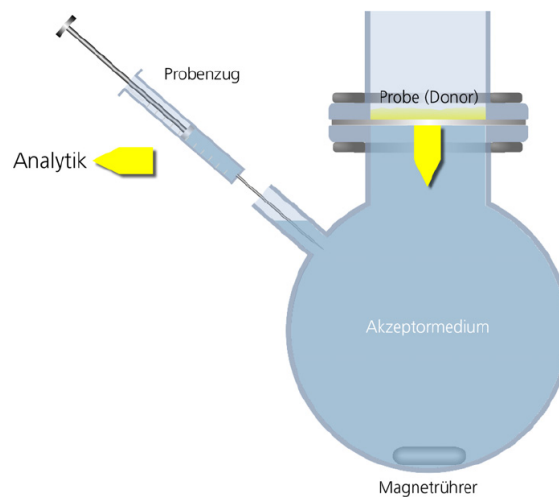
auf 32 °C temperiert und fortlaufend durchmischt werden. Der Zeitpunkt des Puffereinfüllens wurde als Beginn des Experiments ($t = 0min$) festgesetzt und für jede Franzzelle individuell aufgezeichnet. Zwischen dem ersten Kontakt der Creme mit dem Hautkonstrukt und dem Zeitpunkt des Puffereinfüllens vergingen maximal 3 min. Zum Schutz vor Austrocknung und einer damit einhergehenden Veränderung des Donorvehikels wurde das Donorgefäß mit Parafilm verschlossen, ebenso wie der Probenzugsstutzen.

Aus jeder Franzzelle wurden 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 und 7 Stunden nach Beginn des Experimentes Proben zu 250 µl entnommen und der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zugeführt. Aus der Franzzelle entnommener Puffer wurde durch frischen Puffer ersetzt. Die Bestimmung der permeierten Ibuprofen-Mengen wurde mit einem HPLC-System der Firma Waters (D-Eschborn) durchgeführt, das aus zwei HPLC-Pumpen (Typ 515), einem Autosampler (Typ 717 plus) und einem UV-Detektor (Typ 486) mit Deuteriumlampe bestand. Als stationäre Phase wurde eine C₁₈-Umkehrphase verwendet (Säule Hypersil-ODS, Partikelgröße 5 µm, Säulenabmessungen 125 mm x 4 mm, Alltech Grom, D-Rottenburg-Hailfingen) und als mobile Phase kam eine Mischung aus 54 Volumenteilen gereinigten Wassers, 46 Volumenteilen Acetonitril (Acros Organics) und 2 Volumenteilen Essigsäure (Merck, D-Darmstadt) zum Einsatz. Bei Einhaltung einer Flussrate von $1,7 \frac{ml}{min}$ konnte Ibuprofen nach ca. 4,8 min Laufzeit bei einer Wellenlänge von 246 nm detektiert werden. Der Umrechnung von Peakflächen in Arzneistoffkonzentrationen lag eine Mehrpunktkalibrierung im Bereich von $1 - 25 \frac{\mu g}{ml}$ Ibuprofen zu Grunde (Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,999$) [11, 128]. Aus den ermittelten permeierten Arzneistoffmengen konnten unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel 2003 die kumuliert permeierten Arzneistoffmengen gegen die Zeit aufgetragen werden. Aus den linearen Abschnitten dieses Auftrags ließ sich der Arzneistoffflux für Ibuprofen bestimmen, der für den Vergleich mit den Literaturdaten herangezogen wurde.

3.2.8.3 Metabolisierungsversuche

Zur Klärung der Frage, ob organotypische Hautkonstrukte in der Lage sind, ihnen über das Zellkulturmedium angebotenes Dexpanthenol zum Metaboliten Pantothenensäure zu verstoffwechseln und somit für ihren Zellorganismus nutzbar zu machen, wurde ein Spezialmedium verwendet (MSBM-PF, Biochrom, D-Berlin), das in seiner Zusammensetzung dem MSBM 2% entsprach (siehe hierzu Tabelle 3.2), jedoch nicht den in der Zellkultur üblichen Calciumpantothenatzusatz enthielt.

Drei Tage vor dem Beginn des Experimentes wurde das zur ASC-Kultivierung eingesetzte MSBM 2% gegen MSBM-PF ausgetauscht, um sicherzustellen, dass die Metabolisierungsmessung nicht durch in der Kultivierungsflüssigkeit enthaltenes Pantothenatsup-

**Abb. 3.2:** Modifizierte Franzzelle

plement beeinträchtigt wurde. Zu Beginn der Messung wurde 1 ml MSBM-PF mit 1 mg Dexpanthenol (BASF, D-Ludwigshafen) versetzt, was einer Konzentration von 0,1 % (m/V) entsprach. Je ein ASC wurde in jeweils 1 ml der supplementierten Flüssigkeit drei Tage lang unter Standardbedingungen kultiviert.

Darüber hinaus wurden auch abweichend von der in Abschnitt 3.2.7 vorgestellten Methodik kultivierte Hautkonstrukte in die Metabolisierungsstudie miteinbezogen: Dabei handelte es sich zum einen um Hautkonstrukte, die unter serumfreien Bedingungen gezüchtet worden waren (ASC-SF), und zum anderen um Hautkonstrukte ohne lebende, d. h. ohne metabolisch aktive Zellen (ASC-NV). Hautkonstrukte ohne metabolisch aktive Zellen wurden erhalten, indem ASC 24 h lang in einer SDS-Lösung (200 µg/ml) inkubiert wurden. Über einen MTT-Test wurde die Abwesenheit von metabolisch aktiven Zellen überprüft (vgl. Abschnitt 3.2.9.2).

Der Einschluss von Hautkonstrukten ohne metabolisch aktive Zellen diente dem Zweck ein mögliches falsch-positives Ergebnis der Studie identifizieren zu können, falls Dexpanthenol aufgrund einer Affinität zum zellulären Material oder zum Kollagen des Dermisäquivalentes einer physikalischen Umverteilung aus dem Kulturmedium unterliegen sollte. Serumfrei kultivierte Hautkonstrukte wurden eingeschlossen, da nach früheren Ergebnissen mit Monolayern [129] eine geringere metabolische Aktivität als bei herkömmlich kultivierten Hautkonstrukten erwartet wurde.

Weiterhin wurde mit Dexpanthenol supplementiertes MSBM-PF als zusätzliche Kontrolle ohne die Zugabe eines Hautkonstruktes über drei Tage unter identischen Bedingungen kultiviert, um eine mögliche Instabilität des Dexpanthenols im Medium detektieren zu können.

Nach drei Tagen Inkubation aller Proben und Kontrollen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Konzentration von Dexpanthenol und von dessen Metabolit Pantothersäure im Medium bestimmt und zur Ausgangskonzentration von Dexpanthenol im supplementierten MSBM-PF ins Verhältnis gesetzt. Als Bestimmungsmethode wurde eine Modifizierung der Methode von Nag und Das [130] verwendet, die die quantitative Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) verwendet, da nach Vorversuchen über HPLC keine ausreichende Trennung der beiden zu bestimmenden Substanzen vom Vielstoffgemisch Kultivierungsmedium möglich schien.

Proben und Standardlösungen von Dexpanthenol und Calciumpantothenat wurden hierzu auf HPTLC-Platten (Kieselgel ohne Fluoreszenzindikator, Merck KGaA, D-Darmstadt) mit einem Dispenser aufgetragen (Linomat-III, Camag, CH-Muttenz). Über einen Zeitraum von etwa 20 min wurden die HPTLC-Platten in einer Mischung aus 2-Propanol und gereinigtem Wasser (85+15 Teile (V/V)) entwickelt, bis die Fließmittelfront ca. 80 % der HPTLC-Platte erreicht hatte. Es bildeten sich farbige Flecke, nachdem als Sprühreagenz eine Ninhydrinlösung (3 mg/ml) in mit Wasser gesättigtem n-Butanol auf die getrocknete Platte appliziert worden war und die Platte im Anschluss an das Besprühen 10 min lang auf 105 °C erhitzt worden war, um eine Fraktionierung von Dexpanthenol und Pantothersäure in β -Alanol bzw. β -Alanin zu erreichen, deren Aminofunktionen dann mit Ninhydrin zu farbigen Addukten reagieren konnten.

Eine repräsentative entwickelte HPTLC-Platte ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Die gefärbten Bereiche konnten im Anschluss an die Entwicklung der Platte durch eine Integration mit dem Scanner II unter Nutzung der CATS Software 3.18 (beides Camag, CH-Muttenz) densitometrisch quantifiziert werden.

3.2.9 Vitalitätsmessungen

3.2.9.1 Lumineszenz-Assay (ATP-Assay)

Bestimmungen des Adenosintriphosphatgehaltes in Zellen, die in Monolayern organisiert waren, konnten mit einem auf der Emission von Lichtquanten beruhenden Assay (Cell-TiterGlo, Promega, USA-Madison) nach der Luciferin-Luciferase-Reaktion (vgl. Formel 3.1) durchgeführt werden. Hierzu verwendete man frisch passagierte Zellen, die in weiße 96-Wellplatten (Nunc, DK-Roskilde) in einer Konzentration von 1000 Zellen/Well eingesät wurden. Dabei wurde das einzupipettierende Volumen auf 100 μ l eingestellt. Nach mindestens 24 Stunden Zeitspanne, die der möglichst vollständigen Anheftung dienen sollte, jedoch noch vor dem Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und zwei Stunden lang gegen die zu testende Zubereitung ausgetauscht. Im Anschluss daran

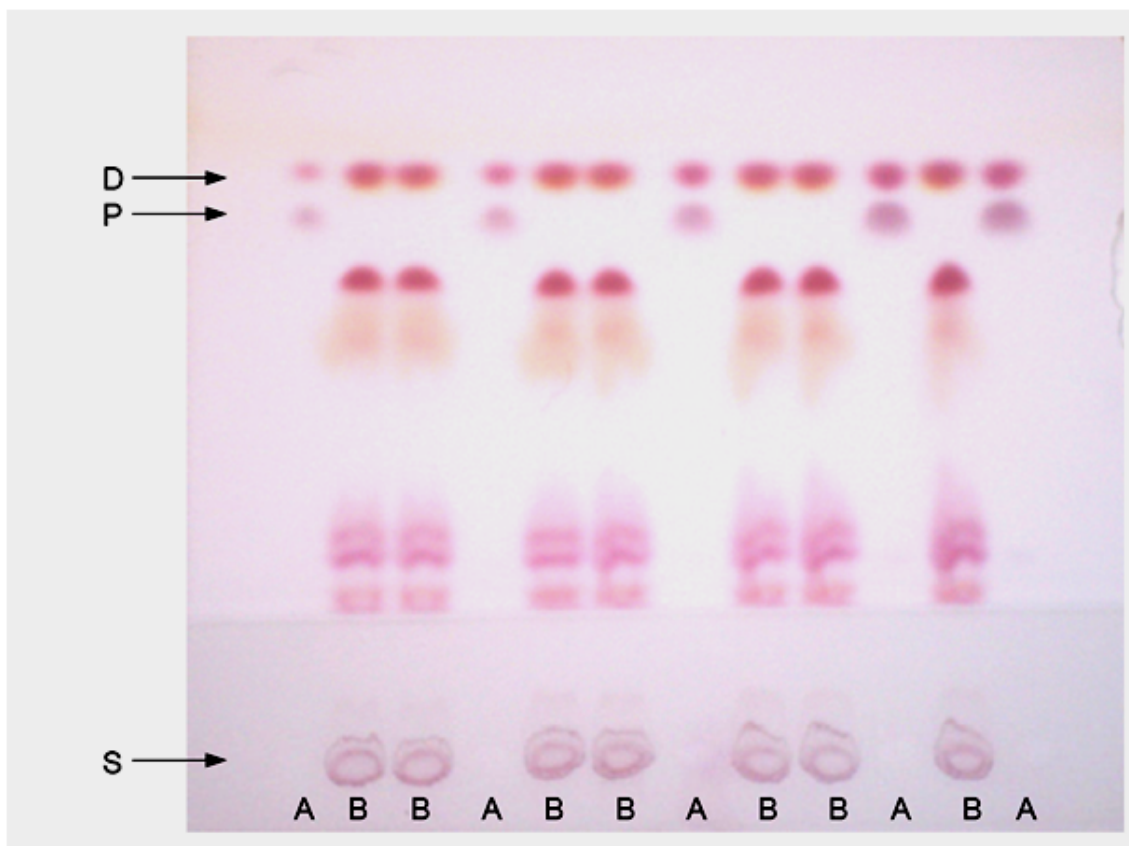


Abb. 3.3: HPTLC-Platte nach der Entwicklung mit Ninhydrin-Sprühareagenz. (A) Chromatogramm der Standardlösungen mit unterschiedlichen Gehalten an Dexpanthenol und Calciumpantothenat; (B) Chromatogramm der zu quantifizierenden Proben; (S) Startposition; farbige Bereiche in der markierten Höhe kennzeichnen Dexpanthenol (D) bzw. Calciumpantothenat (P).

wurde das nach Herstellerangaben frisch rekonstituierte Assay-Reagenz, das auch eine Zellysekomponente enthielt, einpipettiert (jeweils 100 µl pro Well), in einem Multiplattenreader (Genios, Tecan, A-Grödig) durch Schütteln homogenisiert, 10 min inkubiert und die aus den Vertiefungen austretenden Lichtquanten 1000 ms lang integriert. Zur Vermeidung des Auffangens von Lichtquanten benachbarter Vertiefungen wurde dabei eine ca. 6 mm dicke schwarz lackierte Metallschablone mit zur Multiwellplatte passenden Bohrungen auf die zu vermessende Platte aufgelegt. In früheren Versuchen konnte eine Linearität für den Zusammenhang zwischen der Zahl vitaler Zellen und dem Detektorsignal, angegeben in relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) für einen Bereich von 100 - 10.000 Zellen / Well demonstriert werden [129]. Zum Vergleich verschiedener Messungen miteinander und zwecks Umrechnung der RLU in ATP-Konzentrationen wurden zusätzlich ATP-Standardlösungen auf die zu vermessenden Platten aufgetragen und nach Zugabe der Assaylösung mitvermessen (ATP Standard Solution, Lonza, B-Verviers).

Für die Bestimmung des ATP-Gehaltes in dreidimensionalen Geweben war eine Anpassung des Assays notwendig, da dieser lediglich für die Bestimmung an Monolayern oder Suspensionszellen intendiert und in der Literatur beschrieben war [131]. Da die lytische Aktivität nicht ausreichte um Hautkonstrukte in angemessener Zeit und ohne Signalverlust aufzuarbeiten, wurde das zu vermessende Hautkonstrukt (mASC) in eine Mischung aus 300 µl PBS, 300 µl Assaylösung und 5 µl Silicon-Antischaummittel (Sigma-Aldrich, D-Seelze) gegeben, die sich in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß befand. Nach der Zugabe von etwa 600 mg Glasperlen (Durchmesser 0,50-0,75 mm, Retsch, D-Haan) als Mahlhilfe wurde das Gewebe in einer Schwingmühle (MM301, Retsch, D-Haan) 10 min lang bei 30 Hz homogenisiert, so dass im Gewebe enthaltenes ATP durch die Assaychemie erfasst werden konnte. Zur Erfassung eines Signalabfalls durch die starke mechanische Beanspruchung wurde eine ATP-haltige Standardlösung mit den oben genannten Mengen an Reagenzien versetzt und ebenfalls der Schwingmühlenbehandlung unterzogen.

Aus dem Homogenisat wurden je drei Aliquots zu 100 µl gezogen, die in weiße 96-Wellplatten überführt und im Anschluss nach Zugabe von 100 µl des Assayreagenzes analog zu dem für Monolayer beschriebenen Verfahren vermessen wurden.

In Voruntersuchungen wurde darüber hinaus der zweiseitige Lumineszenzassay ViaLight HS (Lonza, B-Vervies) eingesetzt, der demselben Prinzip folgt wie der CellTiter Glo Assay und vergleichbare Ergebnisse erzeugte. Aufgrund des benutzerfreundlicheren Einschrittverfahrens wurde jedoch der CellTiter Glo Assay standardmäßig anstelle des ViaLight HS verwendet.

3.2.9.2 Kolorimetrischer Assay (MTT-Assay)

Die Erfassung der glycolytischen Aktivität des zellulären Materials und damit seines Metabolisierungsstatus geschah durch die Verwendung von Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich, D-Seelze) in 0,5 %-iger wässriger Lösung.

Zur Analyse von im Monolayer gewachsenen Zellen wurden diese nach der Passage in transparente 24-Well-Platten eingesät. Hierzu wurden 100.000 Zellen enthaltende Aliquots der Zellsuspension verwendet, sofern nicht anders angegeben. Nach dreitägiger Inkubation und vor Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und gegen eine Untersuchungslösung ausgetauscht, die das zu charakterisierende Agens enthielt. Bei Anwendung einer Verdünnungsreihe sowie einer Negativkontrolle (Lösung ohne zu prüfendes Agens) konnten im Rahmen der späteren Auswertung Parameter wie die IC_{50} (Konzentration, bei der die Vitalität auf 50 % des Ausgangswertes abfällt) angegeben werden. Nachdem die das zu untersuchende Agens enthaltende Lösung entfernt und anhaftende Reste mit salinischem Phosphatpuffer abgespült worden waren, konnte der Zellrasen mit einer Mischung aus MTT-Stammlösung (100 μ l) und Kultivierungsmedium (900 μ l) zwei Stunden lang unter Standardbedingungen inkubiert werden. Im Anschluss wurde die überstehende Lösung verworfen, so dass das je nach glycolytischer Aktivität mehr oder weniger stark durch das entstehende Formazan blau-violett gefärbte biologische Material mit einer Lyselösung aufgeschlossen werden konnte. Die Lyselösung setzte sich zusammen aus Natriumlaurylsulfat (2,73 g), Salzsäure (32-35 %-ig; 3,64 g), gereinigtem Wasser (88,18 g) sowie 2-Propanol (905,45 g) [132] und war durch das enthaltene 2-Propanol in der Lage, das schlecht wasserlösliche Formazan in Lösung zu bringen.

Die entstandene blau-violette Lösung konnte in einem Multiplattenreader mit Monochromator (KC4, BioTek, D-Berlin) bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen werden.

Sollten anstelle von Monolayern organotypische Hautkonstrukte charakterisiert werden, wurden diese zwei Stunden lang (sofern nicht anders angegeben) in eine 12-Well-Platte gegeben, die Lösungen der zu prüfenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen enthielt, und nach Abschluss der Inkubation mit salinischem Phosphatpuffer gespült. Dieser Inkubationsschritt konnte entfallen, wenn die zu beantwortende Fragestellung nicht die Akuttoxizität einer Substanz beinhaltete. Zur Anfärbung der Konstrukte fand die oben beschriebene Mischung aus MTT-Stammlösung und Kulturmedium Verwendung, in welcher die Konstrukte zwei Stunden unter Standardkulturbedingungen verblieben um dann in der MTT-Lyselösung aufgeschlossen zu werden. Nach der Entnahme der entfärbten Konstrukte konnte die gefärbte Lösung wie oben beschrieben in einem Multiplattenreader vermessen werden.

3.2.10 Studienaufbau zur Regenerationsmessung am Monolayer

Zur Aufklärung der Frage, ob Untersuchungen am einfachen Monolayer dermalen Zellen (HDF oder HaCaT) genügen, um potentiell regenerative Therapieoptionen abzu prüfen, wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt, indem die betreffenden Zellarten unmittelbar nach Passagierung in eine 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät wurden (100.000 Zellen je Well) und bis zur Konfluenz im Zellkulturmedium weiterkultiviert wurden. Der Zeitpunkt des Erreichens der Konfluenz wurde durch Betrachten im Lichtmikroskop beurteilt.

Nach Erreichen der Konfluenz wurde der Monolayer einer der folgenden Traumatisierungsoptionen unterworfen:

- Inkubation mit cytotoxischen Agenzien, Konzentration entsprechend der IC_{50} . Hierzu wurden Diclofenac-Natrium, Natriumlaurylsulfat und Cetrimid verwendet.
- Traumatisierung entsprechend der Methode von Grossman et. al. [75] durch „Serum-Starving“, den 48-stündigen Entzug von Serum (0,1 % statt 10 % im Kultivierungsmedium, vgl. Abschnitt 2.4.2).

Nach Zusatz verschiedener Konzentrationen (1,0; 0,1 und 0,0 %) von Dexpanthenol als bekanntermaßen wirksamem Arzneistoff zur Wundheilungsförderung wurde die Vitalität des Monolayers durch den MTT-Test quantifiziert und gegen einen nicht traumatisierten und nicht mit Dexpanthenol behandelten Monolayer verglichen. Die Datenaufnahme erfolgte 72 h nach Traumatisierung als Sechsfachmessung.

Im Falle des Serum-Starvings wurde während der 48-stündigen Entzugsphase Dexpanthenol in Konzentrationen von 1,0; 0,1 und 0,0 % dem serumarmen Medium zugesetzt und direkt nach der Entzugsphase ebenfalls als Sechsfachmessung gegen einen nicht dem Serumentzug ausgesetzten Monolayer über den MTT-Test gemessen.

3.2.11 Studienaufbau zur Evaluation von Arzneistoffen und Arzneistoffzubereitungen

3.2.11.1 Allgemeiner Aufbau

Zur Evaluation einer Substanz oder einer Zubereitung hiervon hinsichtlich ihrer wundheilungsfördernden Eigenschaften wurde eine Charge miniaturisierter Hautkonstrukte (mASC) eingesetzt. Zum Nachweis der in Frage stehenden Eigenschaften erschien es

| Gruppe | Traumatisierung | anschließende Behandlung |
|--------|-----------------|--------------------------|
| A | + | Verum |
| B | + | Placebo |
| C | - | Verum |
| D | - | Placebo |

Tab. 3.4: Zuordnung der vier Studienarme zur jeweils gewählten Vorgehensweise

ratsam, einen Teil der Konstrukte zwecks Traumatisierung vor Beginn der Untersuchungen mit einer Noxe in Kontakt zu bringen, nach deren Einwirken sich eine Regenerationsphase anschließen konnte. Zusätzlich sollten die Daten placebokontrolliert erhoben werden. Daher wurden die Konstrukte dieser Charge vier Gruppen zugewiesen, die alle Kombinationen aus Traumatisierung (ja / nein) und Behandlung mit Verum (ja / nein) abbildeten (Tabelle 3.4). Eine Verblindung der Zuordnung fand aus personellen Gründen nicht statt.

Als traumatisierendes Agens wurde Natriumlaurylsulfat (SDS) gewählt. Da das Ansprechen der Konstrukte auf SDS von Charge zu Charge schwanken konnte, wurde vor Beginn der eigentlichen Studie mit 12 Konstrukten ein Vorversuch entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 3.2.9.2 durchgeführt, um diejenige SDS-Konzentration zu bestimmen, mit der ein Absinken der Zellvitalität von 100 % auf ca. 65-75 % erreicht werden kann. Die auf diese Weise bestimmte SDS-Konzentration wurde dann zur Traumatisierung der hierzu ausgewählten Konstruktgruppen im Rahmen der eigentlichen Studie eingesetzt.

Zu Beginn der Studie (Tag 0) wurden die Konstrukte der Gruppen A und B der SDS-Traumatisierung, gefolgt von Spülen mit salinischem Phosphatpuffer, unterworfen, wohingegen die Konstrukte der Gruppen C und D in dieser Zeit lediglich in PBS kultiviert wurden. Die Konstrukte wurden im Anschluss auf Transwelleinsätzen an der Luft-Medium-Grenze für sieben weitere Tage kultiviert. Den Gruppen A und C wurde in dieser Zeit die Verumbehandlung zur Verfügung gestellt, während in den Gruppen B und D ein korrespondierendes Placebo zum Einsatz kam.

An den Tagen 0, 3 und 7 wurden jeweils acht Konstrukte einer jeden Gruppe dem Transwell entnommen; hiervon wurden vier mittels kolorimetrischem Assay (vgl. Abschnitt 3.2.9.2) und vier mittels Lumineszenzassay aufbereitet (vgl. Abschnitt 3.2.9.1). Die Ergebnisse der Einzelmessungen wurden getrennt nach jeweiligem Assay ausgewertet und als relative Größe in Bezug auf den Mittelwert der Vitalität der Gruppe D am Tag 0 (=100 %) aufgetragen. Eine Signifikanzanalyse schloss sich mittels F- und t-Test an, die durch das Analyse-Add-On der Microsoft Excel 2007 Software geleistet wurde. Als

Signifikanzniveau wurden 5 % gewählt bzw. 0,1 % für ein hochsignifikantes Ergebnis.

3.2.11.2 Dexpanthenol-Studie

Da die verwendeten Zellkulturmedien standardmäßig mit Calciumpantothenat versetzt waren (im Falle des hier verwendeten MSBM 2% lag die Konzentration bei 3,2 ppm), welches den aktiven Metaboliten von Dexpanthenol darstellt, war es erforderlich dieses Medium drei Tage vor Beginn der Studie gegen pantothenatfreies MSBM-PF zu ersetzen (vgl. Abschnitt 3.2.8.3) um die Möglichkeit einer Beeinflussung des Studienergebnisses durch Pantothenatsupplemente zu minimieren.

Als Verumbehandlung erhielten Konstrukte der Gruppen A und C ab Tag 0 MSBM-PF als Medium, das 0,1 % Dexpanthenol enthielt, wohingegen die Konstrukte der Gruppen B und D in nicht supplementiertem MSBM-PF weiter kultiviert wurden. Zusätzlich wurden weitere Konstrukte in die Gruppe A eingeschlossen, die mit Dexpanthenolkonzentrationen von 0,05 %, 0,25 % und 1,0 % in MSBM-PF behandelt wurden, um eine zusätzliche Aussage über dosisabhängige Effekte erhalten zu können.

3.2.11.3 Epoetin beta-Studie

Zur Herstellung des Verums wurde Epoetin beta aus rekonstituiertem NeoRecormon dem Kultivierungsmedium (MSBM 2%, vgl. Tabelle 3.2) in einer Konzentration von 15 U/ml beigemischt. Alle zwei Tage erhielten Konstrukte der Gruppen A und C diese Lösung als Medium. In den Gruppen B und D wurde als Placebokontrolle nicht supplementiertes MSBM 2% ausgewählt. Die Dosis für Experimente am Hautkonstrukt wurde auf 15 U/ml alle zwei Tage festgelegt, nachdem in ersten Studien von subcutanen systemischen Gaben von drei mal wöchentlich 150 U Epoetin alfa je kg Körpergewicht berichtet worden war [133], so dass die Auslösung von Effekten im Modell angesichts der Dosis wahrscheinlich schien.

In einer Variation des im Abschnitt 3.2.11.1 dargestellten allgemeinen Studienablaufs wurde die Epoetin beta-Studie wiederholt, wobei statt SDS Diclofenac-Natrium als traumatisierendes Agens gewählt wurde (Fagron, D-Barsbüttel). Aus organisatorischen Gründen wurden hier abweichend zum allgemeinen Studienaufbau die Proben an den Versuchstagen 0, 5 und 7 gezogen.

| Bestandteil | Funktion | Massenanteil [%] |
|------------------------------------|----------------|------------------|
| Hydroxyethylcellulose 250 HX Pharm | Gelbildner | 3 |
| Glycerol, wasserfrei | Isotonisierung | 2,4 |
| Wasser für Injektionszwecke | | 94,6 |

Tab. 3.5: Zusammensetzung des Placebo-Hydrogels

3.2.11.4 Becaplermin-Studie

Im Fall des Wachstumsfaktors Becaplermin wurde der Wirkstoff nicht dem Medium beigemischt, sondern als Wirkstoffzubereitung in Form des Fertigarzneimittels auf die Konstrukte der Gruppen A und C aufgetragen. Durch Vergleichswägungen konnte hierbei eine mittlere Auftragemenge von ca. 25 µg Becaplermin je cm² Konstruktoberfläche ermittelt werden. Als Placebokontrolle für die Gruppen B und D fungierte ein wirkstofffreies Hydrogel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.5), das zuvor unter Standardbedingungen durch gesättigten, gespannten Wasserdampf sterilisiert worden war [64, 134].

In allen vier Studiengruppen erfolgte das Auftragen des jeweiligen Hydrogels zweitägig.

3.2.11.5 Hydrogel-Studie

Das in der Becaplermin-Studie als Placebo verwendete Hydrogel (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.5) wurde ebenfalls hinsichtlich seiner regenerationsfördernden Eigenschaften untersucht und nahm in dieser Studie daher den Platz des Verums ein, das alle zwei Tage auf die entsprechenden Konstrukte zu applizieren war. Als Placebokontrolle kam kein Gel zum Einsatz, vielmehr wurde hier unter Standardbedingungen in MSBM 2% weiter kultiviert.

Kapitel 4

Versuchsergebnisse und Diskussion

4.1 Proliferationsuntersuchungen

4.1.1 Bestimmung der Proliferation der kultivierten Zellarten

Aus den in der Abbildung 4.1 dargestellten Proliferationsverläufen ließen sich die Generationszeiten der betrachteten Zellarten bestimmen. Für die HaCaT-Zellen wurde mit einem auf die HaCaT-Kultivierung optimierten Zellkulturmedium eine Generationszeit von 0,9 Tagen ermittelt, was mit früheren Untersuchungen übereinstimmte [8]. Die entsprechenden serumfrei kultivierten Primärzellen benötigten zur Zellteilung mit 1,1 Tagen einen etwas längeren Zeitraum. Die Fibroblasten benötigten wie die HaCaT-Zellen ebenfalls nur 0,9 Tage, was bestätigte, dass Fibroblasten in Kokultur mit (primären) Keratinocyten diese überwachen können.

Ermittelte man parallel dazu an jeweils 3000 Zellen in einem Vierfachexperiment die Vitalität der einzelnen Zellarten mittels des ATP-Assays, so erhielt man eine Reihung, die sich mit den Ergebnissen aus der Proliferationsuntersuchung deckte: Während HaCaT-Zellen und HDF-Zellen etwa über die gleiche Menge ATP verfügten und daher gleich stoffwechselaktiv waren (24.478 ± 2.100 RLU (Relative Lumineszenzeinheiten, Angabe als Mittelwert \pm Standardabweichung) bzw. 26.481 ± 399 RLU), konnte den serumfrei kultivierten primären Keratinocyten erwartungsgemäß ein geringerer Wert zugeordnet werden, der für die niedrigere Stoffwechselrate sprach (8.624 ± 1.530 RLU).

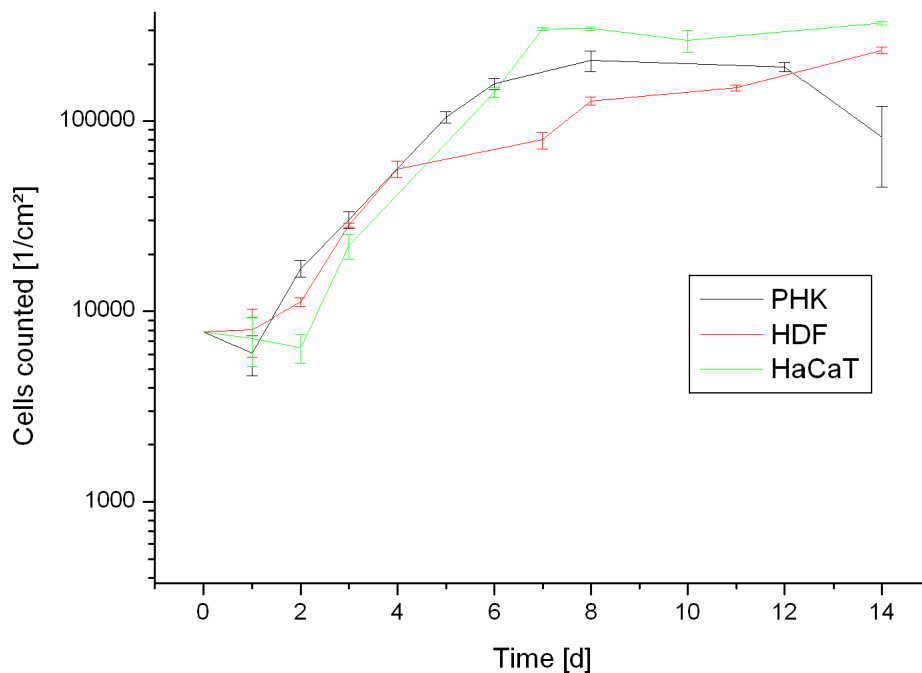


Abb. 4.1: Zellproliferation von primären humanen Keratinocyten (PHK), humanen dermalen Fibroblasten (HDF) und von Zellen der HaCaT-Linie über einen Zeitraum von 2 Wochen

4.1.2 Vollfaktorieller Versuchsplan zur Optimierung der Proliferation der HaCaT-Zelllinie

Nach Kalkulation aller Generationszeiten (vgl. Tabelle 4.1) und der daraus resultierenden Haupteffekte sowie der Standardabweichung (vgl. Tabelle 4.2) konnte ermittelt werden, dass die Veränderung der genutzten Serumcharge wahrscheinlich den Abfall der Zellteilungseffizienz hervorgerufen hatte. Durch die Auswahl eines geeigneteren Serums ließ sich die Generationszeit wieder um 0,88 Tage verkürzen. Dass dennoch ausnahmslos längere Generationszeiten als bei den in Abschnitt 4.1.1 dargestellten Ergebnissen erzielt wurden, ließ sich durch unterschiedliche Medienchargen bzw. verschiedene Medienhersteller erklären.

Die Verwendung eines Passagierungsreagenzes eines anderen Herstellers hatte nur einen tendenziellen Einfluss auf die Generationszeit, da der Wert für den Haupteffekt mit +0,54 Tagen noch unter dem Dreifachen der Standardabweichung lag. Durch eine Wiederholung des Experiments könnte hier ggf. eine weiterführende Aussage getroffen werden. Die verkürzte Inkubationszeit blieb ohne Einfluss auf die Generationszeit, so dass ohne Leistungsverlust eine Variation der Inkubationszeit möglich blieb.

| Lfd. Nr. | Generationszeit [d] |
|----------|---------------------|
| 1 | 2,00 |
| 2 | 1,37 |
| 3 | 2,97 |
| 4 | 1,52 |
| 5 | 1,75 |
| 6 | 1,29 |
| 7 | 2,53 |
| 8 | 1,55 |

Tab. 4.1: Erhaltene Verdopplungszeiten aus dem vollfaktoriellen Versuchsplan; für die Zuordnung der Versuche vgl. Tabelle 3.1

| Faktor | Einfluss auf Generationszeit [d] | Stabw. [d] |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------|
| Serumcharge (Biochrom) | -0,880 * | $\pm 0,246$ |
| EDTA-Hersteller (Biochrom) | +0,540 | $\pm 0,246$ |
| EDTA-Inkubationsdauer (5 min) | -0,185 | $\pm 0,246$ |

Tab. 4.2: Berechnung der Haupteffekte unter Angabe der Standardabweichung; positiver Zahlenwert = Verlängerung der Generationszeit um die angegebene Zeit; negativer Zahlenwert = Verkürzung der Generationszeit; (*) = signifikanter Effekt

Aus Abbildung 4.2, in der die beiden verwendeten Serumchargen farblich unterschiedlich gekennzeichnet wurden, ließ sich der Einfluss des Serums ebenfalls erkennen.

Für das weitere Vorgehen ließ sich ableiten, dass beim notwendigen Wechsel von Serumchargen diese einem Screening in Form einer Proliferationsuntersuchung unterworfen werden sollten, um für den jeweiligen Zellstamm optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Wegen der unter Umständen stark schwankenden Zusammensetzung tierischen Serums wird diese Vorgehensweise auch in der Literatur empfohlen [68].

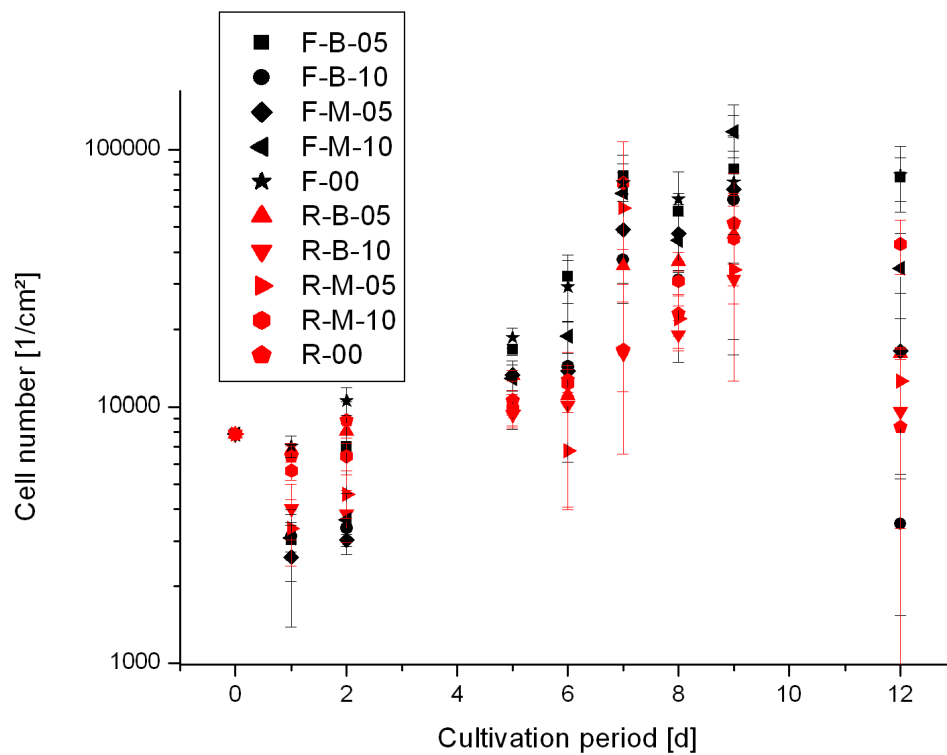


Abb. 4.2: Darstellung aller Zählversuche des Versuchsplans incl. der Kontrollen; schwarze Symbole = Verwendung von Biochrom-FCS; rote Symbole = Verwendung von Fertigmedium Ready-Mix; für die Zuordnung der Legendensymbole vgl. Tabelle 3.1

| Medium | Mittelwert [mosmol/kg] | Stabw. [mosmol/kg] |
|--------------------------------|------------------------|--------------------|
| MSBM-PF | 328 | 2 |
| MSBM-PF mit 0,1 % Dexpanthenol | 329 | 1 |
| MSBM-PF mit 1,0 % Dexpanthenol | 351 | 2 |

Tab. 4.4: Osmolalitäten von Kultivierungsmedien für Regenerationsuntersuchungen; n=4.

4.2 Osmolalitätsmessungen

Für die Kultivierungsmedien, die in den Regenerationsuntersuchungen verwendet wurden, konnten die in Tabelle 4.4 ausgewiesenen Osmolalitäten ermittelt werden.

Bereits das fertig aliquotierte Medium stellte sich als leicht hyperton heraus, so dass der weitere Zusatz von Dexpanthenol einen limitierenden Faktor für das Zellwachstum darstellen konnte. Während dies bei einem 0,1 %-igen Zusatz praktisch nicht feststellbar ist, bedeutete eine Supplementierung des Kultivierungsmediums mit 1 % Dexpanthenol bereits eine Zunahme um 23 mosmol/kg.

Eine Alternative zur Erreichung höherer Supplementkonzentrationen ohne den Verlust an Zellvitalität aufgrund von zu hypertonen Medien in Kauf nehmen zu müssen stellte die Verwendung hypotoner Medien dar, die dann mit entsprechenden Konzentrationen an Supplementen auf isotone Werte eingestellt werden konnten. Im Rahmen einer Wahlpflichtarbeit konnte gezeigt werden, dass HaCaT-Zellen und Fibroblasten hypotone Medien tolerierten und in diesen proliferierten, so dass aufgrund des geringeren Nährstoffangebotes bei einem regelmäßigen Medienwechsel keine Einschränkungen zu erwarten waren [135].

4.3 Regenerationsversuche am Monolayer

Die in der Abbildung 4.3 ausgewiesenen Resultate demonstrierten deutlich, dass durch eine Supplementation mit Dexpanthenol über einen Zeitraum von drei Tagen kein positiver Effekt auftrat, wenn eine Traumatisierung mit Natriumlaurylsulfat in einer Konzentration entsprechend der IC_{50} vorangegangen war. Sowohl bei Monolayern, die aus immortalisierten Keratinocyten aufgebaut waren, als auch bei solchen, die durch Fibroblasten aufgebaut waren, nahmen tendenziell mit zunehmenden Dexpanthenolkonzentrationen die Vitalitätswerte ab. Für die Fibroblasten schien sich unter den Versuchsbedingungen

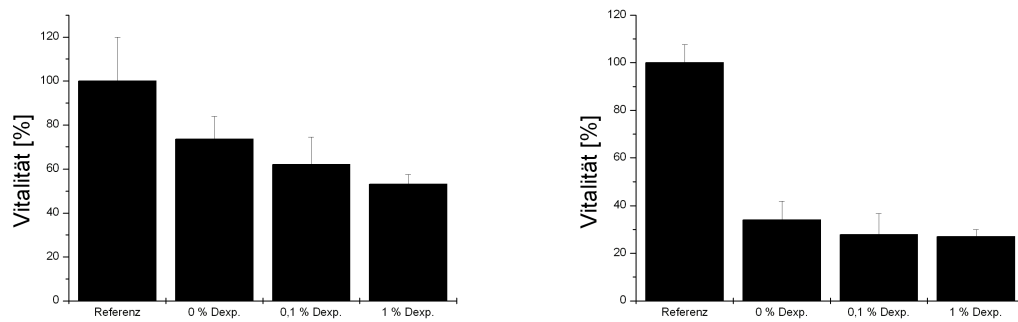


Abb. 4.3: Vitalitätsuntersuchungen an Monolayern nach Traumatisierung mittels SDS und Inkubation mit Dexpanthenol; Referenz = nicht traumatisierter Monolayer; links: HaCaT-Zellen; rechts: HDF-Zellen

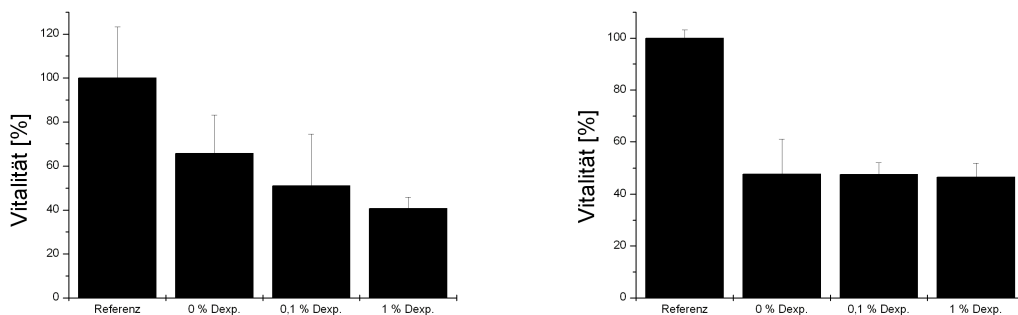


Abb. 4.4: Vitalitätsuntersuchungen an Monolayern nach Traumatisierung mittels Diclofenac-Natrium und Inkubation mit Dexpanthenol; Referenz = nicht traumatisierter Monolayer; links: HaCaT-Zellen; rechts: HDF-Zellen

eine geringere Neigung zur Regeneration des traumatisierten Monolayers zu zeigen, da die Vitalitätswerte deutlicher hinter die Referenz zurückfielen, als dies bei den Keratinozyten der Fall war.

Für die Traumatisierungsversuche mit Diclofenac-Natrium ergab sich ein ähnliches Bild (vgl. Abbildung 4.4), nachdem auch für Diclofenac eine Konzentration entsprechend der IC_{50} eingesetzt worden war: Während sich im Fall der Untersuchungen an Keratinozyten wiederum ein Zusammenhang von höheren Dexpanthenolkonzentrationen mit niedrigeren Vitalitätswerten manifestierte, schienen für Fibroblasten verschiedene Arzneistoffkonzentrationen auf dem hier gewählten Traumatisierungsweg mit der Vitalität in keiner Korrelation zu stehen. Tendenziell erreichten die Fibroblastenkulturen in diesem Versuch allerdings höhere Vitalitätswerte als nach Traumatisierung mit Natriumlaurylsulfat.

Cetrimid schädigte Fibroblastenkulturen nachhaltiger als Natriumlaurylsulfat und Diclofenac-Natrium (vgl. Abbildung 4.5); dies war tendenziell auch für die Keratinocytenkulturen zu beobachten. Übereinstimmend mit den zuvor besprochenen Versuchsreihen konnten

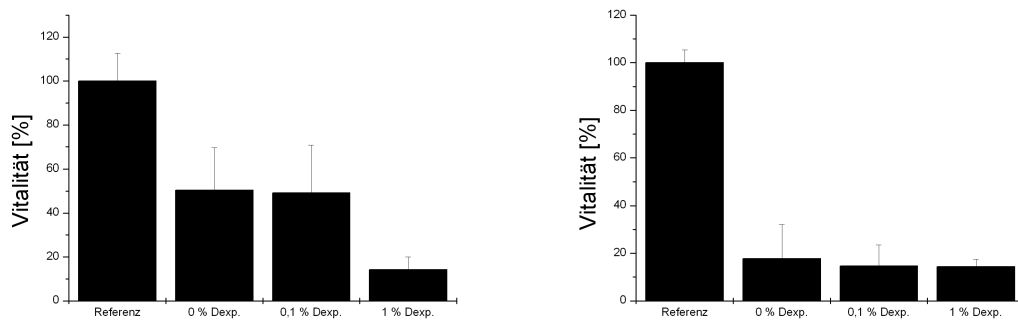


Abb. 4.5: Vitalitätsuntersuchungen an Monolayern nach Traumatisierung mittels Cetrimid und Inkubation mit Dexpanthenol; Referenz = nicht traumatisierter Monolayer; links: HaCaT-Zellen; rechts: HDF-Zellen

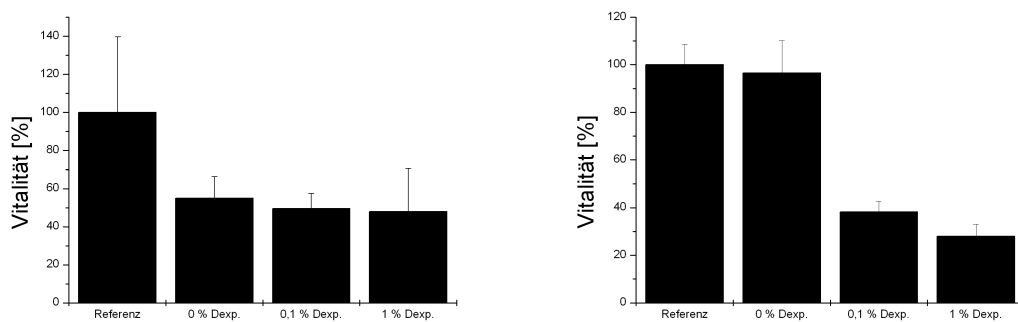


Abb. 4.6: Vitalitätsuntersuchungen an Monolayern nach Traumatisierung mittels Serumentzug und Inkubation mit Dexpanthenol; Referenz = nicht traumatisierter Monolayer; links: HaCaT-Zellen; rechts: HDF-Zellen

regenerative Effekte an den Monolayern durch die Gabe von Dexpanthenol ebenfalls nicht beobachtet werden.

Die Übertragung der Methode von Grossman et al. [75] auf Monolayer ergab keine Vorteile für die Dexpanthenolsupplementation (vgl. Abbildung 4.6). Besonders auffällig war hierbei der Abfall der Vitalität nach Dexpanthenolsupplementation in den Fibroblastenmonolayern. Jedoch zeigte sich auch im Falle der Keratinocytenkulturen ein schwach ausgeprägter Zusammenhang zwischen erhöhten Dexpanthenolgaben und fallenden Vitalitätswerten.

Zusammenfassend blieb festzustellen, dass es trotz Verwendung vier unterschiedlicher Traumatisierungsverfahren mit diesem Modell nicht gelungen war in Zellmonolayerkulturen von humanen dermalen Fibroblasten oder Keratinocyten klinisch relevante Effekte von Dexpanthenol abzubilden. Zwar war es nicht auszuschließen, dass aufgrund von osmotischen Gegebenheiten die 1 %-ige Supplementierung überdosiert war und toxische

Effekte überwogen; dies konnte jedoch nicht erklären, aus welchem Grund auch in der niedrigeren Dosierung keine Effekte erkannt wurden.

Daher musste das einfacher als das organotypische Hautkonstrukt aufzubauende Monolayersystem als nicht geeignet klassifiziert werden mögliche wundheilungsfördernde Wirkstoffe auf ihre regenerativen Eigenschaften hin abzutesten. Die Testung von Wirkstoffzubereitungen wäre mit Monolayerkulturen ohnehin nur eingeschränkt möglich, da ein Auftragen direkt auf die Kultur im Unterschied zum Hautäquivalent nicht praktikabel ist und allenfalls wassermischbare oder in Wasser dispergierbare Systeme prinzipiell einer Analyse zugänglich sind.

4.4 Charakterisierung von Hautäquivalenten

4.4.1 Organotypische Hautäquivalente

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der hier eingesetzten organotypischen Hautäquivalenten mit denen aus Vorgängerarbeiten wurde der Arzneistoffflux für Ibuprofen aus Ibuprofen Creme mittels Permeationsuntersuchungen quantifiziert.

Die Darstellung der kumulierten permeierten Arzneistoffmenge gegen die Zeit findet sich in Abbildung 4.7. Eine lag-Time war nicht festzustellen. Aus dem linearen Anstieg der Beziehung zwischen permeierter Arzneistoffmenge und der Zeit wurde ein Arzneistoffflux von $(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-8} \frac{\text{g}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$ ermittelt. Im Vergleich zu den Literaturangaben $((3,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-8} \frac{\text{g}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}, [8])$ ergab sich für das gleiche Fertigarzneimittel ein geringfügig kleinerer Flux, der auf eine vergleichbar gute bis etwas stärker ausgeprägte Barriereeigenschaft hinwies. Daher ergaben sich keine Indizien, die eine Vergleichbarkeit der kultivierten Hautäquivalente mit Hautäquivalenten aus früheren Untersuchungen in Frage stellten.

4.4.2 Miniaturisierte organotypische Hautäquivalente

Exemplarisch wurden auch miniaturisierte organotypische Hautäquivalente (mASC) einer Charakterisierung durch histologische Schnittbilder unterzogen, obwohl mASC für die Verwendung in zellbasierten Assays intendiert waren und in allen anderen Fällen klassische organotypische Hautäquivalente (ASC) ihrer Größe und besseren Handhabbarkeit wegen für histologische Fragestellungen Verwendung fanden.

Die Charakterisierung der mASC erschien notwendig um sicherzustellen, dass auch im kleineren Maßstab eine vergleichbare Morphologie im Epidermisäquivalent wie bei den

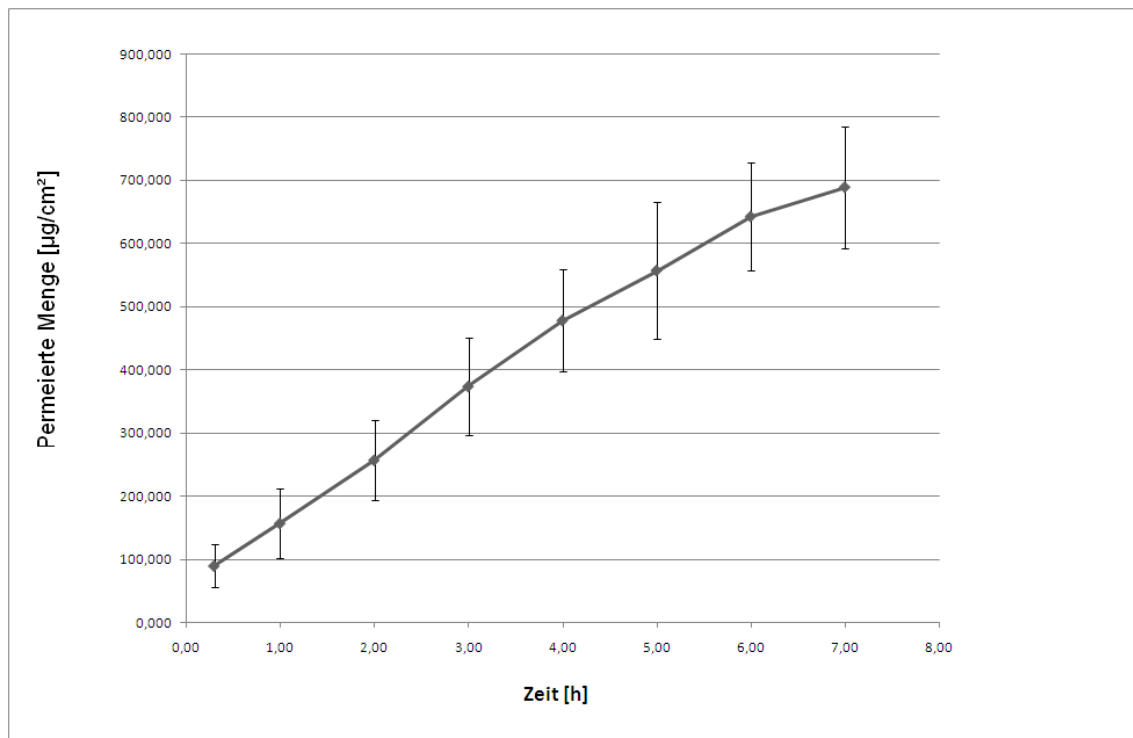


Abb. 4.7: Kumulierte permeierte Ibuprofen-Menge durch organotypische Hautäquivalente; dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung

bereits charakterisierten ASC erreicht werden konnte. In Abbildung 4.8 ist der Schnitt durch ein mASC im Anschluss an die vierwöchige Kultivierungsphase dargestellt.

Ähnlich zu klassischen organotypischen Hautäquivalenten (vgl. hierzu auch Abbildung 4.13A) zeichneten sich auch die miniaturisierten Hautäquivalente durch einen geordneten Epidermisaufbau aus, der zwar nicht die Verhornung der humanen Epidermis nachstellen konnte, dessen Zellen sich jedoch partiell abgeflacht haben und damit Hinweise auf eine beginnende Differenzierung lieferten. Deutlich erkennbar war der mehrschichtige Aufbau, hier mit etwa 6-9 Zellschichten. Die epidermale Schicht saß dem Dermisäquivalent auf, in dessen praktisch nicht angefärbter Kollagenmatrix die spindelförmige Morphologie der anwesenden Fibroblasten erkennbar war.

4.5 Dexpanthenol-Metabolisierung

Die Resultate des Dexpanthenol-Metabolisierungsexperimentes an organotypischen Hautäquivalenten sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Nach Supplementation des pantothenensäurefreien Zellkulturmediums MSBM-PF mit 1 mg Dexpanthenol je ml Medium wurden durch HPTLC-Densitometrie 1021,5 µg/ml wiedergefunden; die Abweichung zu den theoretisch zu erwartenden 1000 µg/ml lag im Bereich

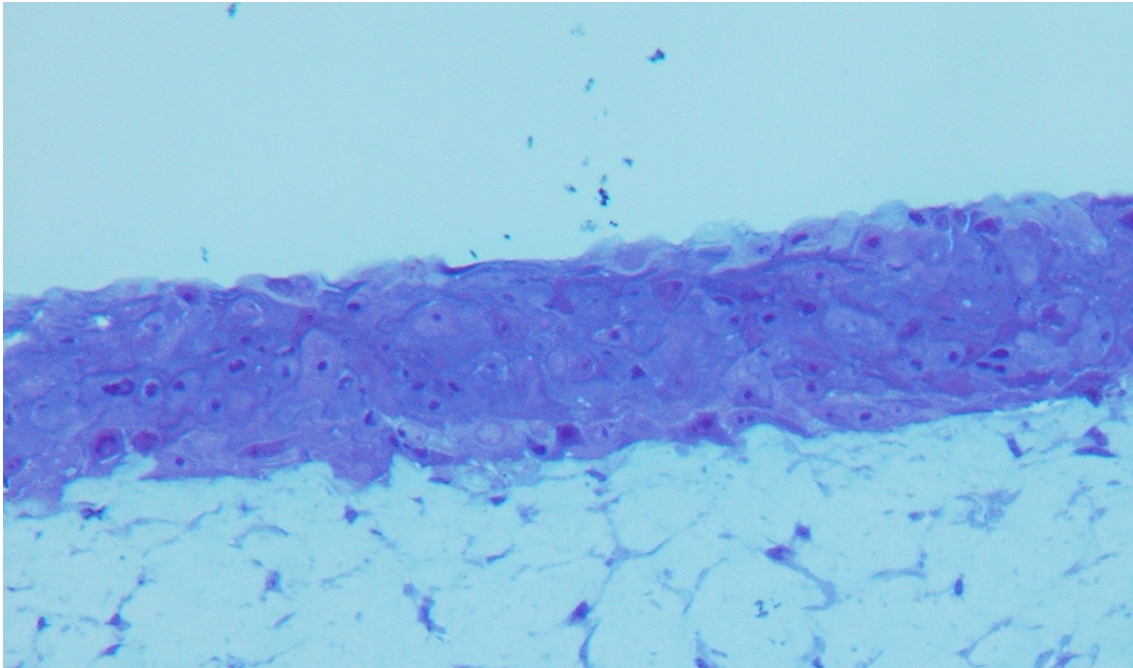


Abb. 4.8: mASC im mit Toluidinblau angefärbten Schnittbild

| Probe | Konz. PS [$\mu\text{g}/\text{ml}$] | Konz. DP [$\mu\text{g}/\text{ml}$] | Wiederfindung DP [%] |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|
| MSBM-PF Tag 0 | 0,0 | 1021,5 | 100 |
| MSBM-PF Tag 3 | 0,0 | $1012,5 \pm 2,2$ | 99,1 |
| ASC Tag 3 | 0,0 | $623,0 \pm 23,7$ | 61,0 |
| ASC-SF Tag 3 | 0,0 | $804,9 \pm 58,0$ | 78,9 |
| ASC-NV Tag 3 | 0,0 | $951,7 \pm 4,4$ | 93,2 |

Tab. 4.5: Durch HPTLC-Densitometrie gemessene Konzentrationen an Pantothersäure (PS) und Dexpanthenol (DP) in mit Dexpanthenol supplementiertem Medium, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=4$.

der Messungenauigkeit, so dass eine Interaktion der Messmethode mit den Bestandteilen des Zellkulturmediums als unwahrscheinlich anzusehen war. Die bestimmte Konzentration wurde zu 100 % gesetzt. Erwartungsgemäß konnte keine Pantothersäure als Intermediat gefunden werden.

Da nach drei Tagen unter Kulturbedingungen der Dexpanthenolgehalt im zellfreien Medium nur auf 99,1 % abgefallen war und sich weiterhin keine Pantothersäure detektieren ließ, konnte von der chemischen Stabilität des Analyten im Rahmen des experimentellen Versuchsaufbaus ausgegangen werden.

Wurde die Lösung hingegen zusammen mit einem vitalen organotypischen Hautkonstrukt (ASC) über die Versuchsdauer hinweg betrachtet, so stellte sich ein deutlich reduzierter Gehalt an Dexpanthenol ein, da nur 61,0 % der Ausgangskonzentration an Dexpanthenol wiedergefunden werden konnten. Da sich das Intermediat Pantothersäure erneut nicht nachweisen ließ, lag der Schluss nahe, dass das vitale ASC in der Lage war Dexpanthenol zu verstoffwechseln. Hierbei kam es jedoch nicht zu einer Sezernierung des Metaboliten Pantothersäure in das umgebende Medium hinein; vielmehr musste von einem intrazellulären Gebrauch des Metaboliten z. B. durch Synthese von Acetyl-CoA ausgegangen werden.

Diese Annahme ließ sich dadurch erhärten, dass für solche Hautäquivalente, die unter serumfreien Bedingungen gezüchtet worden waren und niedrigere Stoffwechselumsätze aufwiesen (ASC-SF), eine geringere Umsatzrate für Dexpanthenol bestimmt wurde, da in diesen Proben nach drei Tagen noch 78,9 % der Ausgangskonzentration an Dexpanthenol feststellbar waren. Das Ausmaß des Abbaus von Dexpanthenol schien also mit der metabolischen Aktivität der Hautäquivalente zu korrelieren.

In Proben mit Hautäquivalenten, die keine metabolisch aktiven Zellen mehr beinhalteten (ASC-NV), fiel die Dexpanthenolkonzentration auf 93,2 % des Ausgangswertes am Tag 0 ab. Zwar sank der Dexpanthenolgehalt stärker als in den Kontrollproben, die ausschließlich Medium und Dexpanthenol enthielten (MSBM-PF; -0,9 % versus -6,8 %), dennoch war klar ersichtlich, dass der in den Proben ASC und ASC-SF festzustellende Gehaltsabfall nicht in erster Linie auf Effekte wie Verdünnungs- oder Verteilungsvorgänge bzw. Adsorption an Kollagen oder durch Kollagen katalysierte Abbauvorgänge zurückzuführen war. Wesentlich wahrscheinlicher erschien eine Verstoffwechslung durch die vitalen Zellen der eingebrachten Hautäquivalente. Somit erschien es sinnvoll das Regenerationsmodell „organotypisches Hautäquivalent“ mit dem bekanntermaßen wundheilungsfördernden Wirkstoff Dexpanthenol zu evaluieren, da von dessen Verwertbarkeit durch die Konstrukte auszugehen war.

4.6 Evaluierung des Regenerationsmodells organotypisches Hautäquivalent

Um die prinzipielle Eignung des organotypischen Hautäquivalents als Regenerationsmodell analysieren zu können, wurden mit Dexpanthenol und Becaplermin-Hydrogel ein Wirkstoff sowie eine Wirkstoffformulierung in die Untersuchungen miteinbezogen, deren regeneratives Potential unter klinischen Bedingungen bekannt war.

4.6.1 Ermittlung der IC_{50} zur Herstellung der traumatisierenden SDS-Lösung

Vor der eigentlichen Untersuchung wurde die IC_{50} für die in der jeweiligen Untersuchung zu verwendende Charge an mASC evaluiert. Die Ergebnisse sind exemplarisch für eine Charge graphisch in Abbildung 4.9 dargestellt. Für die hier dargestellte Charge wurde die IC_{50} bei einer SDS-Konzentration von 230 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ermittelt. Um keine irreparable Traumatisierung zu induzieren wurde jedoch eine geringere Konzentration an SDS vorgewählt, so dass noch etwa 75-65 % Restvitalität nach Inkubation mit der SDS-Lösung zu erwarten waren. Im vorliegenden Fall wurde die Traumatisierungslösung daher auf 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen befanden sich stets in einem Bereich von 100-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Diese Bandbreite ging auf die trotz ähnlicher morphologischer Merkmale festzustellende Chargenvariabilität der Hautäquivalente zurück.

4.6.2 Alterungsstabilität

Es musste gewährleistet sein, dass die verwendeten Hautäquivalente über den Untersuchungszeitraum hinweg eine für die Messungen ausreichend große Vitalität aufwiesen. Ideales Verhalten der Konstrukte hätte eine gleichbleibende Vitalität über den zeitlichen Verlauf des Experimentes (1 Woche nach Abschluss der Konstruktkultivierung) vorausgesetzt. In Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse einer einwöchigen Kultivierung unter Standardbedingungen im Anschluss an die vierwöchige Kultivierungsdauer der Hautäquivalente dargestellt. Um eine höhere Aussagekraft der über den MTT-Test ermittelten Daten zu erreichen, wurden zur Bestimmung jedes Datenpunktes 9-10 Hautäquivalente eingesetzt.

Während einer Periode von sieben Tagen war kein Abfall der Vitalität erkennbar. Durch die Zunahme der Vitalität und auch deren Standardabweichung im zeitlichen Verlauf ver-

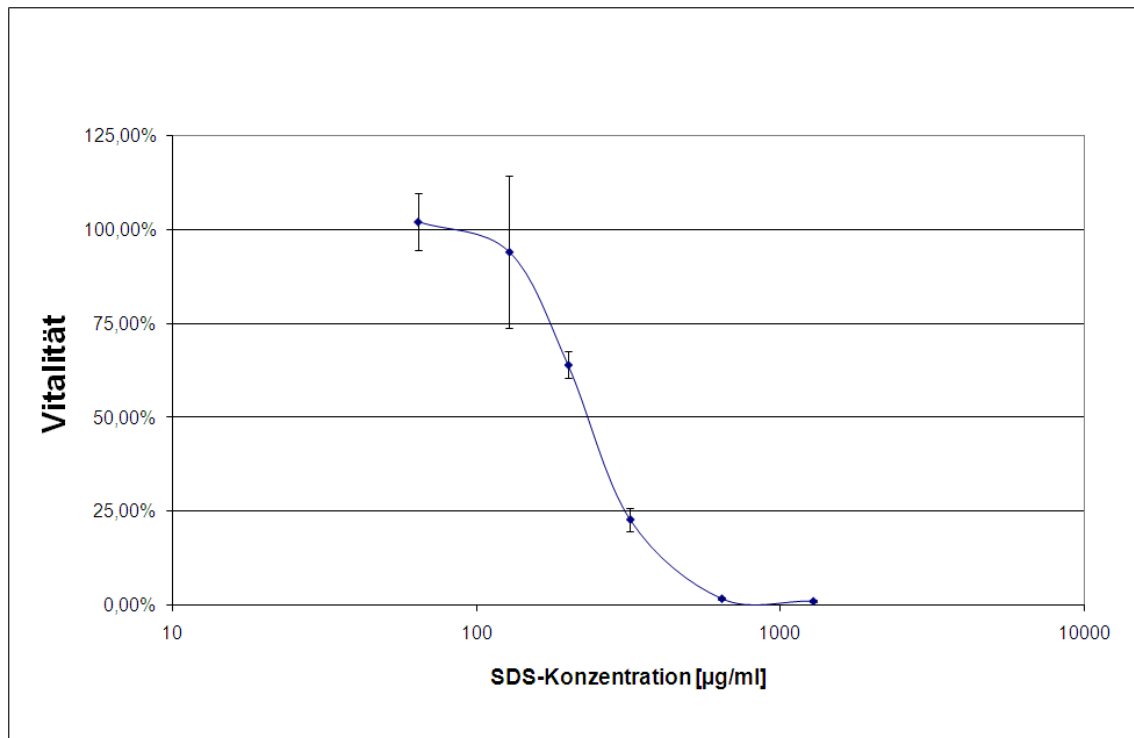


Abb. 4.9: Ermittlung der IC_{50} einer beispielhaften Charge von Hautäquivalenten über den MTT-Test; Vitalität einer Positivprobe ohne SDS = 100 %

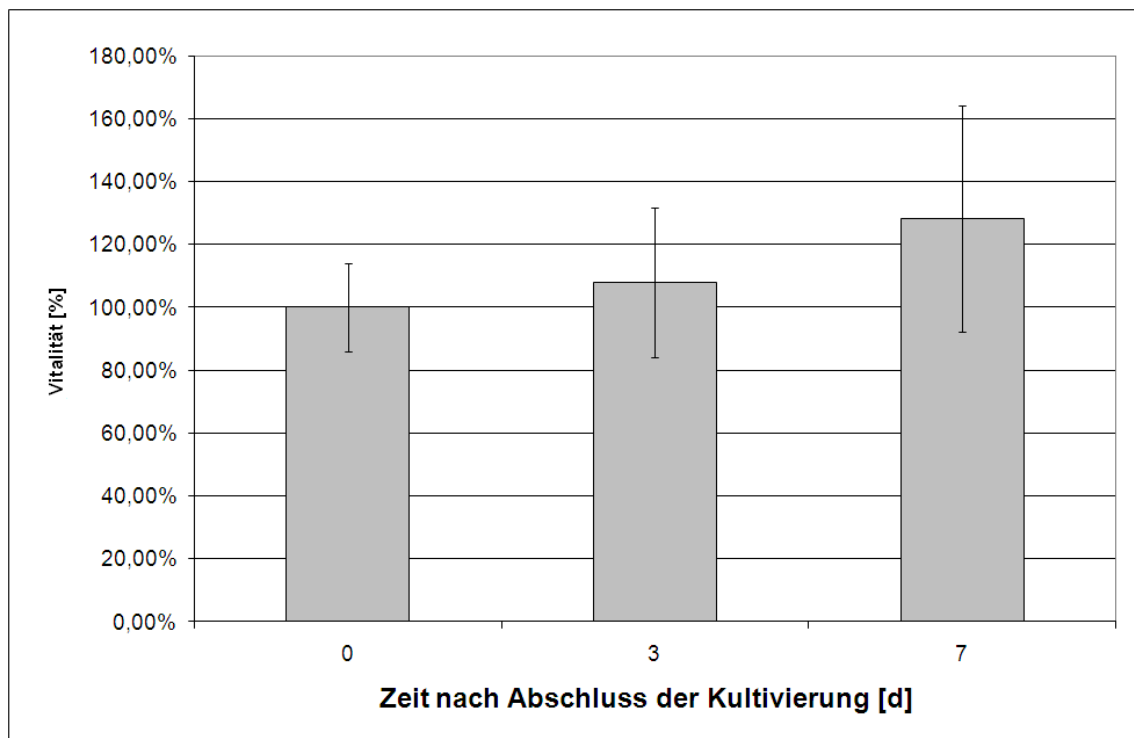


Abb. 4.10: Alterungsstabilität der Hautäquivalente über 7 Tage im Anschluss an ihre Fertigstellung; Vitalitätsdaten aus dem MTT-Test, $n=9-10$ je Datenpunkt, Vitalität am Tag 0 = 100 %

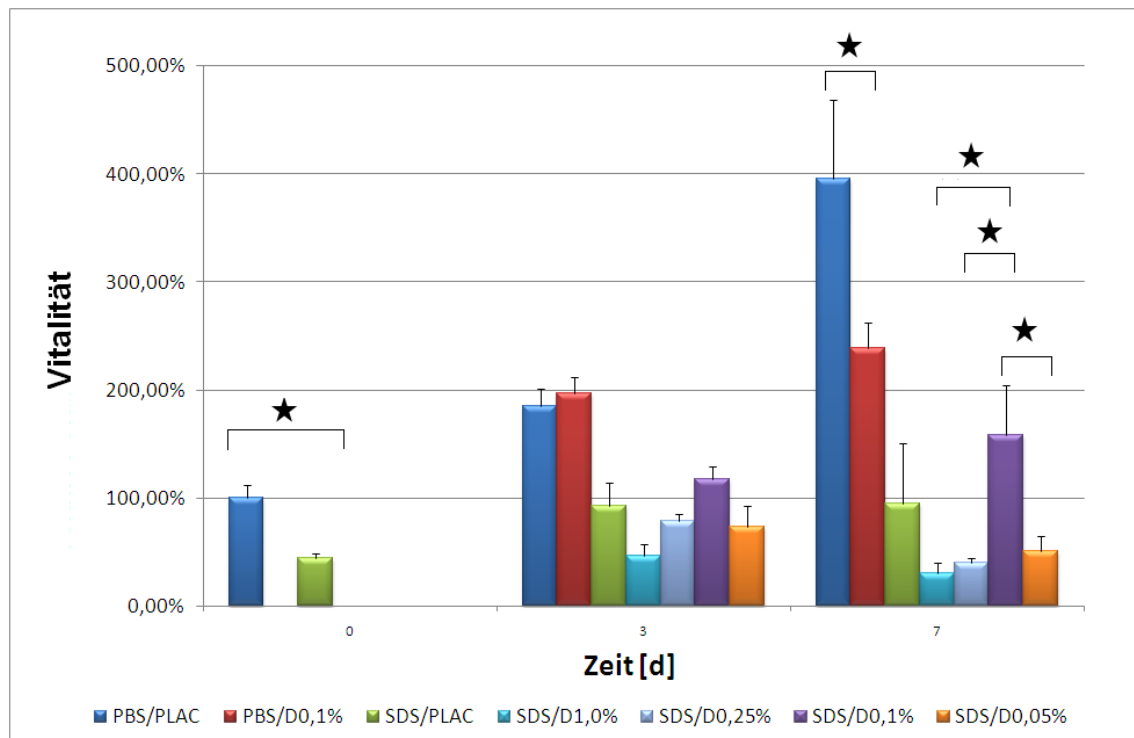


Abb. 4.11: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Dexpanthenol-Studie bei Auswertung über MTT. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Placebogruppen (PLAC), Verumgruppen (D) mit Konzentrationsangaben für Dexpanthenol, $n=4$ für jeden Datenpunkt, (*) = $P < 0,05$.

hielten sich die Konstrukte jedoch nicht idealtypisch. Die zeitliche Entwicklung konnte auf eine noch vorhandene Proliferationsrate im Epidermisäquivalent des Hautkonstruktes zurückgeführt werden, die sich in einer Vitalitätssteigerung von 28 % manifestierte. Da weder ein deutlicher Vitalitätsverlust noch ein Absterben der Hautäquivalente detektiert wurde, konnte dennoch die prinzipielle Eignung des Modells in Bezug auf die Kultivierbarkeitsdauer bejaht werden.

4.6.3 Dexpanthenol-Studie

4.6.3.1 MTT-Test

Zur Feststellung einer möglichen Dosisabhängigkeit der Dexpanthenol-induzierten Effekte wurden in derjenigen Charge, deren Auswertung über den MTT-Test vollzogen wurde, Dexpanthenol-Konzentrationen zwischen 0,05 % und 1 % nach Exposition gegenüber der traumatisierenden SDS-Lösung evaluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 und in Tabelle 4.6 dargestellt; dabei entsprechen 100 % der Vitalität eines nicht traumatisierten Konstruktes zu Beginn der Untersuchung.

Im Verlauf der Kultivierung der nicht traumatisierten und nicht mit Dexpanthenol be-

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|--------------|--------|--------|----------|
| PBS | 100±12 | 185±16 | 396±72 * |
| PBS/D 0,1 % | | 197±15 | 239±23 |
| SDS | 44±4 | 93±21 | 95±55 |
| SDS/D 1,0 % | | 46±11 | 30±10 |
| SDS/D 0,25 % | | 74±18 | 40±5 |
| SDS/D 0,1 % | | 118±11 | 158±46 † |
| SDS/D 0,05 % | | 78±7 | 51±14 |

Tab. 4.6: Werteblatt zur Abbildung 4.11; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (D) = Dexpanthenolzusatz in angegebener Konzentration; (*) = signifikant verschieden von der korrespondierenden Verumbehandlung; (†) = signifikant verschieden von SDS/D 1,0%, 0,25 % und 0,05 %; $P < 0,05$.

handelten Konstrukte stellten sich steigende Vitalitätswerte ein, die zwar in der Tendenz mit den Ergebnissen zur Alterungsstabilität übereinstimmten (vgl. Abschnitt 4.6.2), die sich jedoch im Ausmaß der Vitalitätszunahme von den zuvor an einer anderen Charge ermittelten Werten unterschieden, da nach einer Woche etwa das Vierfache der Ausgangsvitalität erreicht wurde, was für eine stärkere Proliferationsneigung in den hier untersuchten Hautäquivalenten sprach. Neben unterschiedlichen Medienchargen wurde im Unterschied zum hier besprochenen Experiment bei der Ermittlung der Daten zur Alterungsstabilität ein pantothensäurehaltiges Standardmedium verwendet. Dies könnte neben prinzipiellen Unterschieden zwischen einzelnen Chargen auch einen Beitrag zur Differenz der beiden Versuchsreihen geliefert haben. Da auch in der hier vorgestellten Reihe kein Absterben der Kontrollgruppe stattfand, konnte trotz der Chargenvariabilität von einer Aussagekraft der Daten ausgegangen werden.

Diejenige Gruppe von Hautäquivalenten, die nicht traumatisiert wurde, jedoch mit dem Verum, einer 0,1 %-igen Dexpanthenolkonzentration im Medium, weiterbehandelt wurde, trug erwartungsgemäß keinen Nutzen aus der Supplementation davon. Während nach drei Tagen noch keine Unterscheidung im Messignal der beiden nichttraumatisierten Gruppen möglich war, stellte sich nach einer Woche ein signifikanter Unterschied ein, der einen Nachteil für eine Inkubation mit Dexpanthenol ohne vorangehende Traumatisierung bedeutete.

Traumatisierte Hautäquivalente zeichneten sich zu Beginn der Untersuchung durch eine in etwa halbierte Vitalität gegenüber den nicht traumatisierten Hautäquivalenten aus. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war signifikant. Zwar fiel die Schädigung durch SDS damit stärker aus, als es mit der verwendeten SDS-Konzentration intendiert war.

Dennoch konnten sich einzelne Subgruppen der Studie nach Traumatisierung im Verlauf der Studie wieder dem Ausgangswert von 100 % Vitalität annähern oder diesen Wert sogar übertreffen (SDS/PLAC nach 3 und 7 Tagen sowie SDS/D0,1 % nach ebenfalls 3 und 7 Tagen). Es konnte daraus abgeleitet werden, dass auch nach entsprechend starken Traumatisierungen von Konstrukten prinzipiell noch die Möglichkeit zur Regeneration bestand.

Wurde nach Traumatisierung kein Dexpanthenol verwendet, regenerierte sich das Konstrukt folglich dennoch, so dass sich zur mit 0,1 % Dexpanthenol supplementierten Gruppe nur tendenzielle Unterschiede ausmachen ließen, die hinter der statistischen Signifikanz zurück blieben. Von Interesse war jedoch, dass in der mit Dexpanthenol nachbehandelten Gruppe nach drei Tagen tendenziell und nach sieben Tagen auch signifikant zwischen der 0,1 %-igen Supplementierung und allen anderen Supplementkonzentrationen differenziert werden konnte. Die 1 %-ige Konzentration bewirkte einen Abfall in der Zellvitalität, der vermutlich mit den osmotischen Effekten dieser Wirkstoffkonzentration in Verbindung stand (vgl. Abschnitt 4.2). Die Ursache für den Abfall der Vitalität in Konzentrationen, die kleiner als 0,1 % waren, blieb unklar: Zwar erschien es plausibel, dass geringere Wirkstoffkonzentrationen eines regenerativen Wirkstoffes kleinere Vitalitätswerte hervorriefen, jedoch sollten dann für diese geringeren Konzentrationen keine Nachteile gegenüber einer Dexpanthenol-freien Kultivierung erwartet werden, wie sie hier festgestellt wurden.

4.6.3.2 ATP-Test

Zur Untermauerung der Ergebnisse wurde die Studie mit einer neuen Konstruktcharge wiederholt und über einen zweiten Vitalitätsassay, den ATP-Assay, abgesichert, indem in den mit Dexpanthenol behandelten Gruppen eine Konzentration von 0,1 % Wirkstoff ausgewählt wurde. Die Resultate können der Abbildung 4.12 sowie der Tabelle 4.7 entnommen werden. Wiederum entsprechen 100 % einer Vitalität eines nicht traumatisierten Konstruktes zu Beginn der Untersuchung.

Die Traumatisierung zu Beginn der Studie führte zu einem Vitalitätsverlust von 31 % gegenüber den nichttraumatisierten und in salinischem Phosphatpuffer inkubierten Hautäquivalenten. Der Vitalitätsunterschied war signifikant und lag bei dieser Charge im Bereich des intendierten Schädigungsausmaßes. Drei Tage nach Beginn der Untersuchungen zeigte sich in der nichttraumatisierten und nicht behandelten Kontrollgruppe ein Vitalitätsanstieg. Dies könnte sich erneut über eine Proliferation im Epidermisäquivalent erklären lassen. Allerdings fiel die Vitalität im Unterschied zu den mittels MTT-Assay erhobenen Daten am siebten Tag der Untersuchung wiederum ab. Anders als die für den

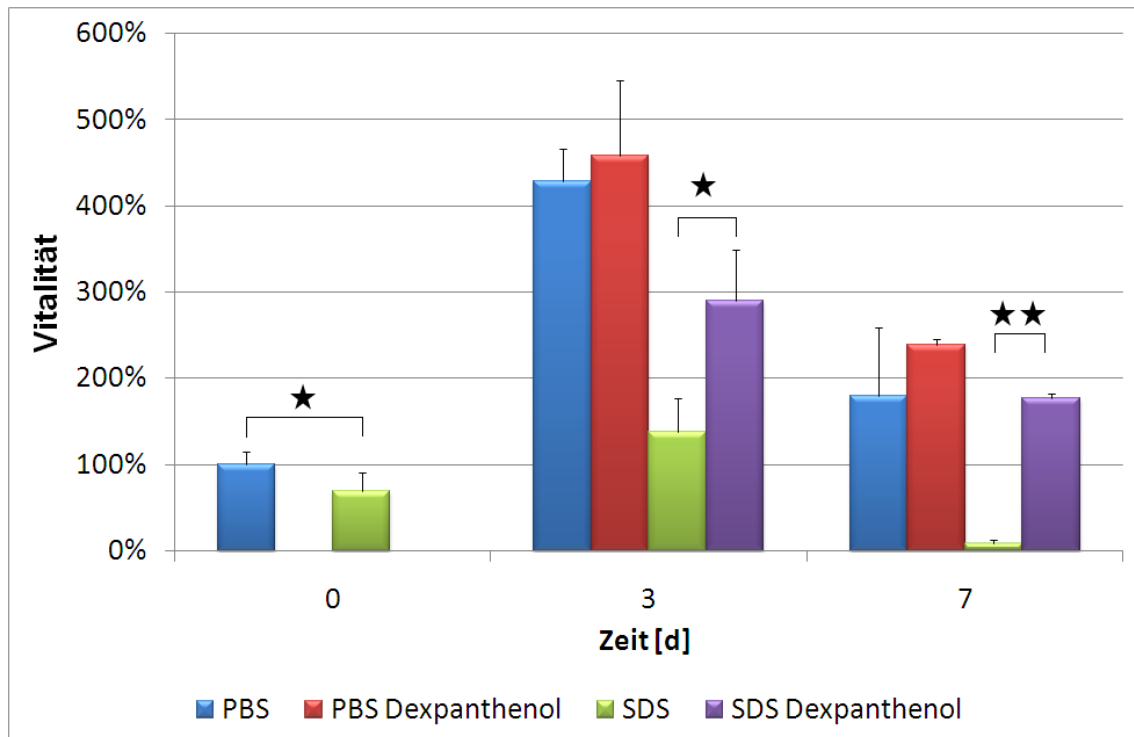


Abb. 4.12: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Dexpanthenol-Studie bei Auswertung über ATP-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Verumgruppen (Dexpanthenol) behandelt mit 0,1 % Dexpanthenol, n=4 für jeden Datenpunkt, (★) = $P < 0,05$; (★★) = $P < 0,001$.

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|----------|----------|
| PBS | 100±15 | 429±38 | 180±79 |
| PBS/Verum | | 458±88 | 239±7 |
| SDS | 69±22 | 138±22 | 8±4 |
| SDS/Verum | | 290±59 ★ | 177±5 ★★ |

Tab. 4.7: Werteblatt zur Abbildung 4.7; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (★) = signifikant verschieden von der korrespondierenden Verumbehandlung ($P < 0,05$); (★★) = hochsignifikant verschieden von korrespondierender Placebobehandlung ($P < 0,001$).

MTT-Assay verwendete Charge schien die hier in die Untersuchung eingebundene Charge bereits nach sieben Tagen das Ende der möglichen Kultivierungsdauer erreicht zu haben, was sich in sinkenden Vitalitätswerten durch Zelluntergang und / oder durch eine Einstellung der Proliferation ausdrückte, in deren Folge der Zellmetabolismus herunter reguliert worden war.

Da die relative Konstruktivitalität an diesem Datenpunkt (Kontrollgruppe nach sieben Tagen) immer noch 180 % betrug und der Zellstoffwechsel trotz abnehmender Vitalität nicht zum Erliegen gekommen war, lagen keine Anhaltspunkte vor, die gegen eine Aussagefähigkeit der erhobenen Daten sprächen. Dennoch blieb als Ergebnis festzuhalten, dass Konstruktchargen, die sich weder in ihren Kultivierungsparametern (Proliferation der eingesetzten Zellen, Kultivierungstechnik, Medien- und Serumchargen) noch in ihrem äußeren Erscheinungsbild unterschieden, eine Chargenvariabilität aufweisen konnten, die sich im zeitlichen Verlauf der Vitalität ausdrückte. Daher erschien es sinnvoll für die folgenden Studien das Abprüfen von Fragestellungen an einer einzelnen Charge von Konstrukten vorzunehmen.

Unter Einbeziehung der mit Dexpanthenol behandelten nicht traumatisierten Hautäquivalentgruppe ergab sich, dass die Vitalitätswerte statistisch nicht signifikant von denjenigen der Kontrollgruppe abwichen. Insoweit wurden die Erwartungen gestützt, dass sich kein Vorteil einer Dexpanthenolsupplementation ohne vorherige Traumatisierung einstellen würde. Nach sieben Tagen resultierte - unter Berücksichtigung der Standardabweichungen - nur eine Tendenz ($P \approx 0,05$), die für eine Favorisierung der Dexpanthenolgabe sprach, während sich im MTT-Assay noch ein statistisch nachweisbarer Nachteil durch die Dexpanthenolsupplementierung ergeben hatte. Wahrscheinlich beruhte dieser Befund auf den unterschiedlichen intrazellulären Zielstrukturen, die durch die beiden verschiedenen Assays adressiert wurden.

Während die im MTT-Assay ausgewertete Kontrollgruppe der dort benutzten Hautäquivalentcharge nach drei Tagen ihre Vitalität verdoppelt und nach sieben Tagen wiederum etwa verdoppelt hatte auf das Vierfache der ursprünglichen Vitalität, erreichte die Kontrollgruppe im ATP-Assay schon nach drei Tagen das in etwa Vierfache (429 %) der Ausgangsvitalität. Dies könnte als eine anfänglich stärkere Neigung zur Proliferation der im ATP-Assay benutzten Charge sprechen. Infolge dieses überschießenden Vitalitätszuwachses könnte sich die folgende Depletion des intrazellulären Pantothenensäurespiegels dann in einer raschen Begrenzung der weiteren Proliferation ausgewirkt haben, so dass nach sieben Tagen eine Herunterregulierung des Stoffwechsels erfolgte und die Dexpanthenolgabe tendenzielle Vorteile bieten könnte. Diese Hypothese kann zwar nicht den sich im MTT-Assay ergebenden Nachteil aus der Dexpanthenolsupplementation erklären, der sich für nicht traumatisierte Hautäquivalente einstellte, unterstreicht aber die

Forderung nach Verwendung einer einzelnen Charge für die jeweilige Fragestellung.

Im ATP-Assay stellten sich in der Gegenüberstellung der beiden traumatisierten Hautäquivalentengruppen nach drei Tagen signifikante und nach sieben Tagen sogar hochsignifikante Unterschiede ein. Eine 0,1 %-ige Supplementierung mit Dexpanthenol bedeutete einen statistisch belegbaren Vorteil für diejenigen Hautäquivalente, die einer vorherigen Traumatisierung unterzogen worden waren. In der traumatisierten und nicht mit Verum behandelten Gruppe fielen die Vitalitätswerte auf nahezu 0 % ab, was einen Untergang der lebensfähigen Zellen in den untersuchten Konstrukten nahelegte.

Zusammenfassend lässt sich für MTT- und ATP-Test sagen, dass sich die klinischen Effekte von Dexpanthenol am In-vitro-Experiment mittels Hautäquivalent reproduzieren ließen, sofern die Hautäquivalente zuvor mit SDS (hier: 200 µg/ml) inkubiert worden waren und gleichzeitig Dexpanthenol in einer Konzentration zugesetzt wurde, die an die osmotischen Zwänge angepasst war und sich daher von den in zugelassenen Externa verwendeten Konzentrationen unterschied.

4.6.3.3 Histologische Analyse

Wie sich an Abbildung 4.13, Bildteil A, erkennen lässt, wiesen die Hautäquivalente am Tag 0 der Studie, d. h. am Tag ihres Kultivierungsabschlusses im Rahmen der Herstellung, eine mehrschichtige Entsprechung zur humanen Epidermis auf. Das Epidermisäquivalent enthielt etwa 4-6 Zellschichten, die keine Hornschicht ausbildeten, wie sie von humaner Haut bekannt ist. Dennoch ließen sich Abflachungen von Zellen ausmachen, die für eine fortschreitende Differenzierung sprachen. Das Epidermisäquivalent ruhte auf einem Dermisäquivalent, dessen Hauptbestandteil Kollagen sich kaum mit Toluidinblau anfärben ließ. Ansatzweise konnten Fibroblasten nachgewiesen werden, die sich in wesentlich geringerer Zahl als Keratinocyten im Hautkonstrukt befanden und in der Dermis eingebettet waren.

Wurde mit Natriumlaurylsulfat (hier: 200 µg/ml) inkubiert, führte dies zu einer partiellen Zerstörung der epidermalen Barriere (vgl. Abbildung 4.13, Bildteil B). Im Einzelnen bedeutete die SDS-Einwirkung das Ablösen der äußersten Zellschichten, was durch sich aus dem Zellverbund lösende Zellen erkenntlich war, einen Organisationsverlust der Epidermis im Vergleich zum Bild 4.13A sowie eine Zellschwellung, die mit einem nekrotischen Geschehen in den mit SDS in Kontakt gekommenen Zellen assoziiert sein konnte. Zusätzlich waren einzelne kollabierte Zellen (nach Cytoplasmaaustritt) sichtbar.

Wurden die traumatisierten Konstrukte nach drei Tagen erneut histologisch analysiert, so stellten sich erkennbare Unterschiede ein, je nachdem ob das betreffende Konstrukt

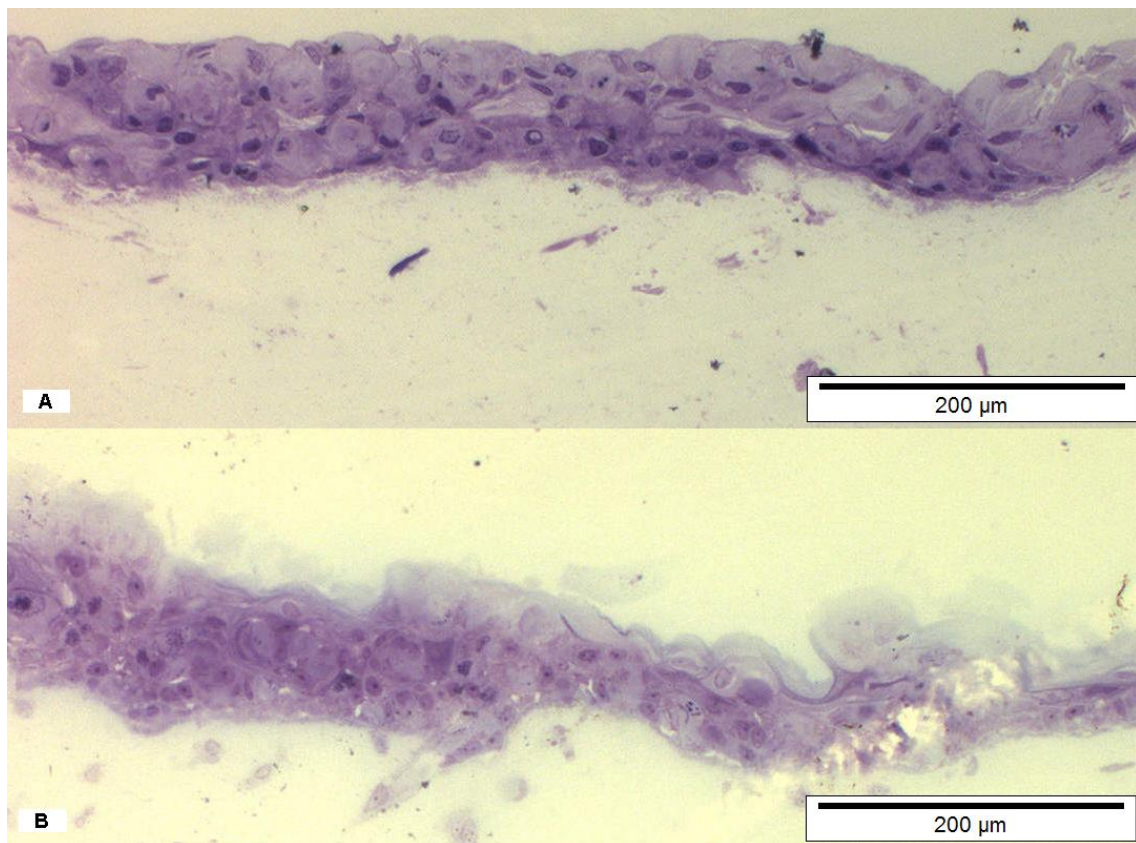


Abb. 4.13: Schnitt durch mit Toluidinblau angefärbte Hautäquivalente (ASC) am Tag 0 der Dexpanthenolstudie. Nichttraumatisiertes ASC (A), ASC nach Traumatisierung mit Natriumlaurylsulfat (B)

unter Zusatz von 0,1 % Dexpanthenol im Medium kultiviert worden war oder ob ein Dexpanthenolzusatz nicht vorgenommen worden war (vgl. Abbildung 4.14).

Trotz des geringen Kontrastes im Toluidinblauschnitt in Abbildung 4.14A erkennt man, dass eine Kultivierung über drei Tage ohne Dexpanthenolzusatz eine fortschreitende Zerstörung der epidermalen Barriere induzierte. Im Schnittbild dominierten aufgeblähte Zellkörper, die deutlich für das Vorliegen von nekrotischen Vorgängen sprachen. Diese Entwicklung erfasste das Epidermisäquivalent in vollem Umfang. Da Nekrose üblicherweise innerhalb eines kurzen Zeitrahmens von Minuten bis wenigen Stunden nach Kontakt mit der Noxe auftritt, dieses Bild jedoch drei Tage nach Inkubation mit SDS entstand, spricht der histologische Befund dafür, dass das SDS trotz Abwaschens mit salinischem Phosphatpuffer nach Abschluss der Inkubationsphase zu einem Ausmaß noch im oder am Hautäquivalent verblieben sein musste, das relevanten Konzentrationen für zytotoxische Effekte entsprach.

Unter Dexpanthenolsupplementierung waren bereits nach drei Tagen erste deutliche Anzeichen einer Regeneration des Epidermisäquivalentes feststellbar (vgl. Abbildung 4.14B). Offensichtlich bedingt durch 0,1 % Dexpanthenol im Kultivierungsmedium wurde eine Proliferation von Keratinocyten der HaCaT-Linie in den tiefer gelegenen Regionen des Epidermisäquivalentes angestoßen. Diese Lokalisierungshypothese wurde dadurch untermauert, dass sich die oberen epidermalen Schichten als nekrotische, aufgeblähte und kontrastschwache Regionen präsentierten, unterhalb derer normales Keratinocytenwachstum sichtbar war. Da im Zellkulturmodell praktisch kaum Möglichkeiten für eine Abschliffung toter Zellschichten bestanden, erschien es plausibel, dass diese toten Schichten auf den sich von unten regenerierenden Zellschichten aufgelagert bleiben mussten.

Die Hypothese, dass die Regeneration des Epidermismodells durch vermehrte Proliferation in den tiefer gelegenen Keratinocytenschichten vollzogen wird, lässt sich auf zwei Arten untermauern: Einerseits besteht die Möglichkeit, dass tiefer gelegene Zellschichten temporär besser vor der SDS-Einwirkung geschützt waren. Hierfür spricht der an Bild 4.13B besprochene Befund. Andererseits könnte aufgrund einer partiellen Differenzierung der Keratinocyten im Epidermisäquivalent eine höhere Mitoserate nur noch in tiefer gelegenen Regionen festgestellt werden, was dann den physiologischen Verhältnissen in der Humanhaut entspräche, da dort die Mitoseaktivität überwiegend von den Zellen des Stratum basale ausgeht [20].

Nach insgesamt sieben Tagen seit der Exposition gegenüber SDS setzten sich die beschriebenen Befunde fort, indem die epidermale Zellschicht deutlich proliferierte und Keratinocyten mit aberranter Histologie nur noch in den äußersten Zellschichten feststellbar waren, wie in der Abbildung 4.15A zu sehen ist. Es bildete sich eine vielschich-

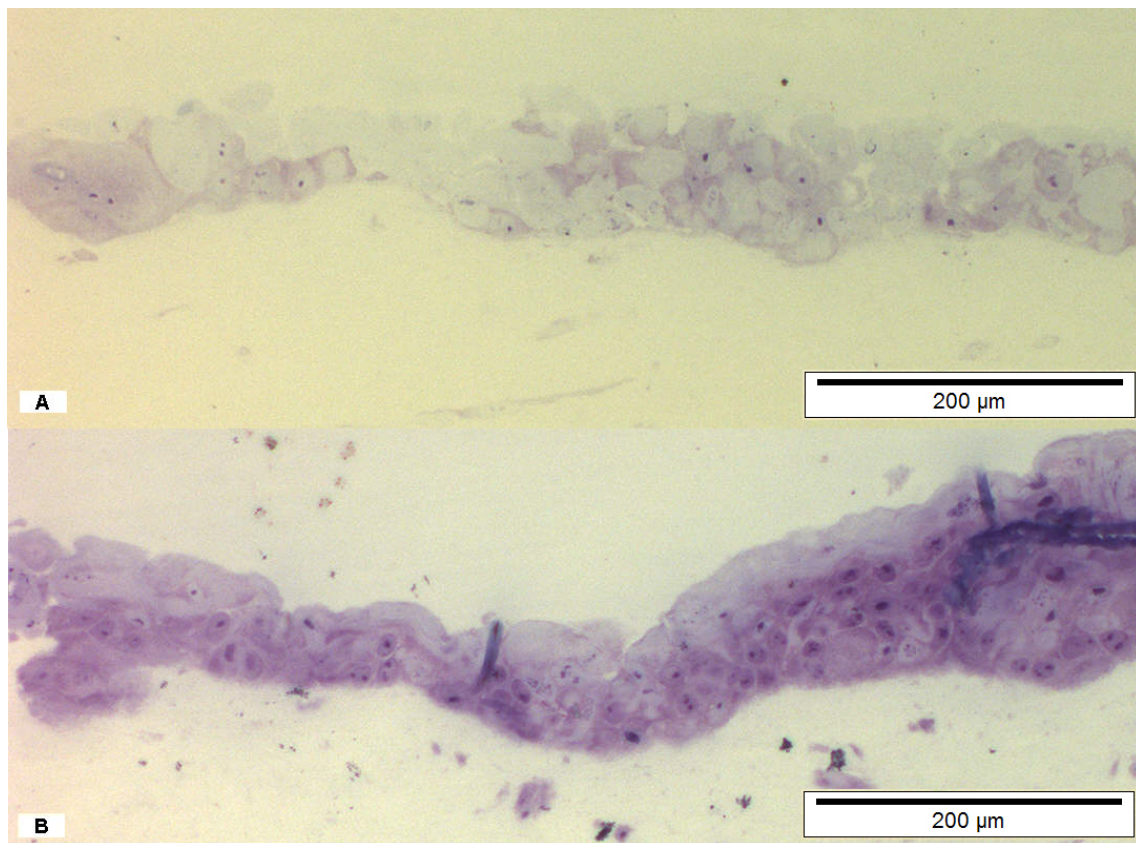


Abb. 4.14: Schnitt durch mit Toluidinblau angefärbte Hautäquivalente (ASC) am Tag 3 der Dexpanthenolstudie. Traumatisiertes ASC, kultiviert ohne Dexpanthenolsupplementation (A), traumatisiertes ASC mit Dexpanthenolsupplementation (B)

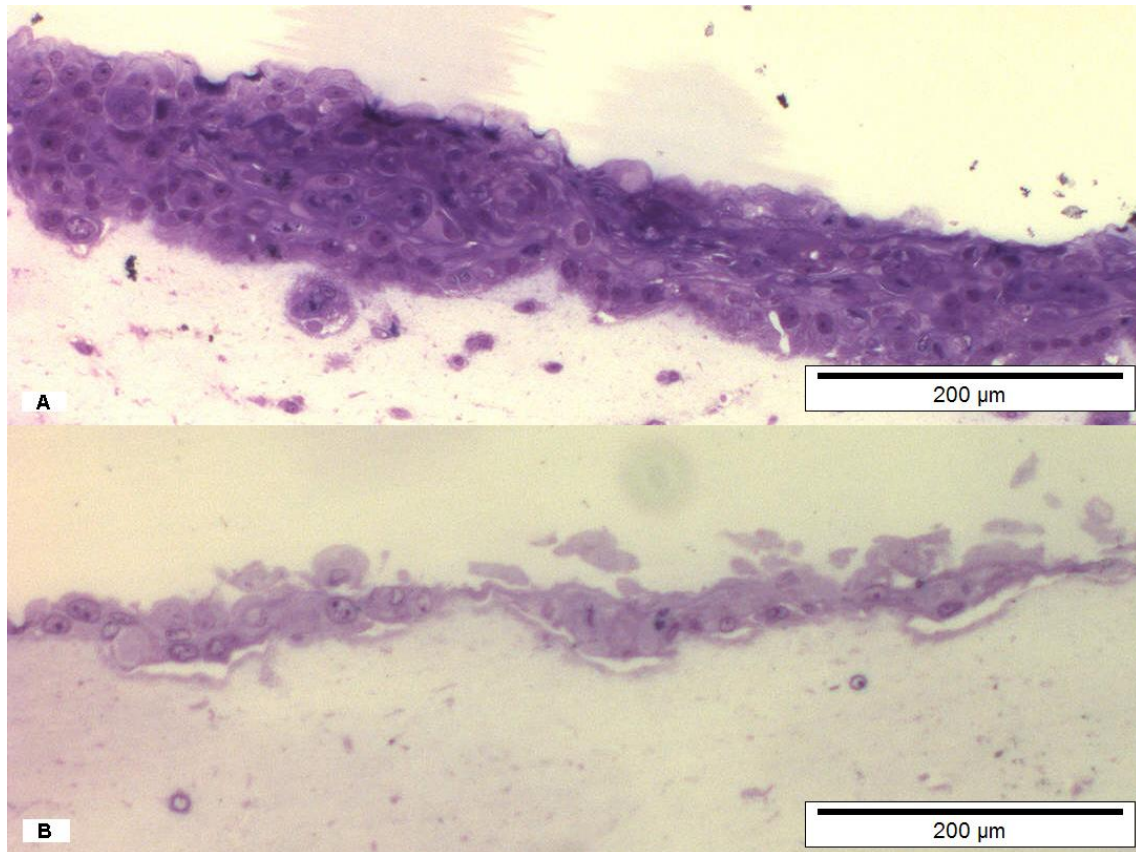


Abb. 4.15: Schnitt durch mit Toluidinblau angefärbte Hautäquivalente (ASC) am Tag 7 der Dexpanthenolstudie. Traumatisiertes ASC, kultiviert mit Dexpanthenolsupplementation (A), traumatisiertes ASC ohne Dexpanthenolsupplementation (B)

tige Struktur aus, die in ihrer Morphologie als typisch für proliferierende Keratinocyten beschrieben werden kann und mehr Zelllayer als in der Ausgangssituation am Tag 0 beinhaltete (im Vergleich zu Abbildung 4.13A). Bis zu 9 übereinander geschichtete Zelllagen waren sichtbar.

Den Erwartungen entsprechend schritt der Organisationsverlust des Epidermisäquivalentes ohne Dexpanthenolzugabe fort (vgl. Abbildung 4.15B). Das Bild war gekennzeichnet durch Zelltrümmer und nekrotische Zellen. Die epidermalen Strukturen lösten sich flächig von ihrer Kollagenunterlage ab. Dies sprach für den Untergang des Epidermisäquivalentes.

4.6.3.4 Zwischenfazit

Es ist gelungen die aus der klinischen Anwendung bekannten regenerativen Eigenschaften von Dexpanthenol im Modell nachzustellen. Hierzu wurden Daten aus zwei verschiedenen zellulären Assays sowie histologischen Untersuchungen eingesetzt. In der zentralen Aussage kamen beide zellulären Assays zu ähnlichen Ergebnissen, obwohl der Vorteil der

0,1 %-igen Dexpanthenolsupplementation nur im ATP-Assay die Hürde zur statistischen Signifikanz nahm. Die Standardabweichungen, die beim ATP-Test auftraten, übertrafen die in der Literatur beschriebenen und für dermale Zellen reproduzierten Standardabweichungen, die bei Monolayern gemessen wurden. Offensichtlich ging im Rahmen der komplexen Probenaufbereitung dreidimensionaler Gewebe ein Teil der Präzision verloren, so dass diese nun mit dem MTT-Assay am Hautkonstrukt vergleichbar war.

Die Datenlage der zellulären Assays ließ sich durch die histologischen Untersuchungen eindeutig belegen; auch hier war ein relevanter Vorteil durch die Supplementation von Dexpanthenol festzustellen.

Im Ergebnis wird das Konzept des traumatisierten Konstruktes als Regenerationsmodell durch dieses Resultat gestützt, indem ein Modellarzneistoff als solcher eingesetzt und dem Kulturmedium beigemischt wurde. Die Bearbeitung einer Fragestellung an einer Hautäquivalentcharge schien empfehlenswert.

4.6.4 Becaplermin-Studie

In der zweiten Studie wurde der Modellarzneistoff nicht als solcher, sondern im Unterschied zur Dexpanthenol-Studie als Zubereitung (hier: als 0,01 %-iges Hydrogel) zur Evaluation des Regenerationsmodells herangezogen. Die Untersuchungen an zellulären Assays erfolgten an mASC-Chargen einer Charge; die histologischen Untersuchungen wurden an einer aus dem selben Herstellprozess gewonnenen ASC-Charge durchgeführt. Als Placebo fungierte ein wirkstofffreies Gel, dessen Zusammensetzung in Tabelle 3.5 vorgestellt wurde.

4.6.4.1 MTT-Test

Die Resultate des MTT-Assays sind in der Abbildung 4.16 sowie der besseren Übersicht wegen zusätzlich in Tabelle 4.8 dargestellt. Im Ausgangspunkt kam es wieder zu einer nachweislichen Traumatisierung der Hautkonstrukte durch die ausgewählte SDS-Konzentration; hierbei fiel die Vitalität auf 60 % der Vitalität der nicht traumatisierten Gruppe, deren Vitalität erneut als 100 %-Wert festgelegt wurde.

Bei der hier verwendeten Konstruktcharge blieb in der nur mit Placebo behandelten und nicht mit SDS traumatisierten Kontrollgruppe die Vitalität im weiteren zeitlichen Verlauf tendentiell stabil; nach sieben Tagen war im Rahmen der Messwertschwankungen wieder die Vitalität des Ausgangspunktes erreicht. Dies sprach für die Eignung der hier eingesetzten Konstruktcharge im Rahmen des einwöchigen Versuchsaufbaus, auch wenn der

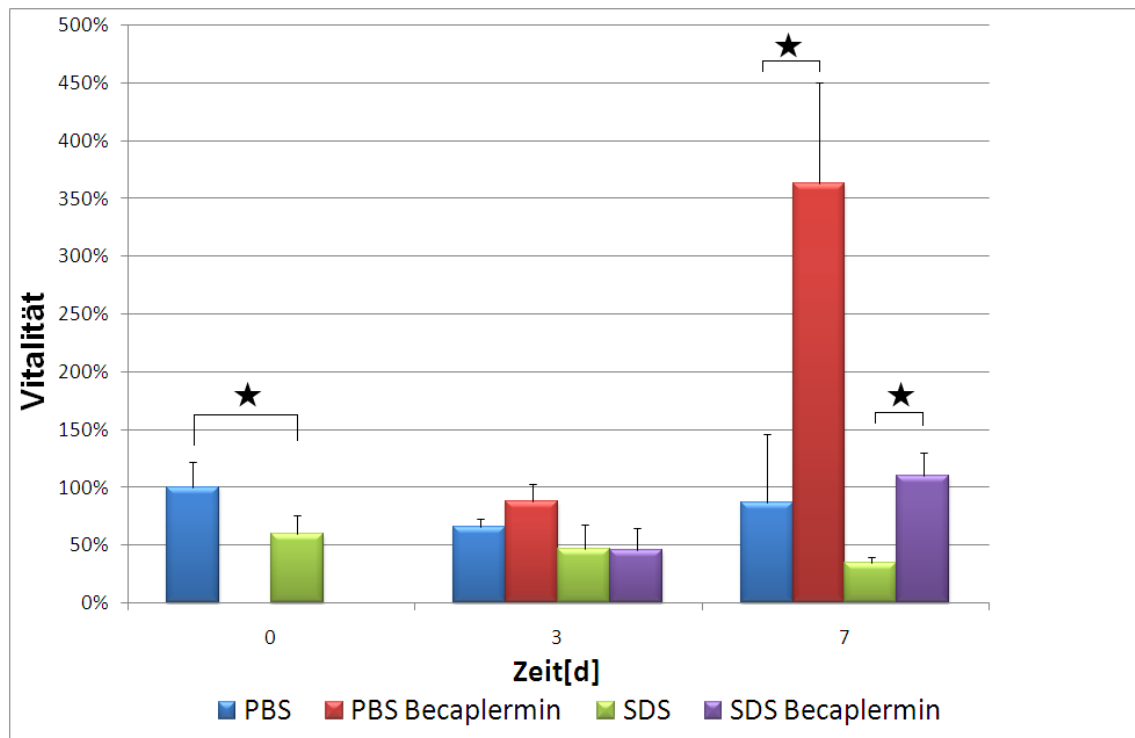


Abb. 4.16: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Becaplermin-Studie bei Auswertung über MTT-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Verumgruppen (Becaplermin) behandelt mit 0,01 %-igem Hydrogel, n=4 für jeden Datenpunkt, (★) = $P < 0,05$

zeitliche Vitalitätsverlauf vom in der Dexpanthenolstudie mit anderen Konstruktchargen generierten Verlauf erneut abwich. Da sich die Kontrollgruppe über die Studiendauer hinweg als ausreichend vital erwies, bestand kein Grund die in diesem Versuch erhaltenen Daten zu verwerfen. Zusätzlich konnte erwartungsgemäß von der fehlenden Toxizität des Placebohydrogels ausgegangen werden.

Während es nach drei Tagen weder innerhalb der traumatisierten noch innerhalb der nicht vorgeschädigten Gruppen zu signifikanten Unterschieden mit bzw. ohne Becaplermin-Gabe gekommen war, ließ sich nach sieben Tagen der Einfluss des rekombinanten Wachs-

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|-------|----------|
| PBS | 100±22 | 66±7 | 87±60 |
| PBS/Verum | | 88±15 | 363±87 ★ |
| SDS | 60±16 | 47±21 | 35±5 |
| SDS/Verum | | 45±19 | 110±20 ★ |

Tab. 4.8: Werteblatt zur Abbildung 4.16; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (★) = signifikant verschieden von der korrespondierenden Placebobehandlung; $P < 0,05$.

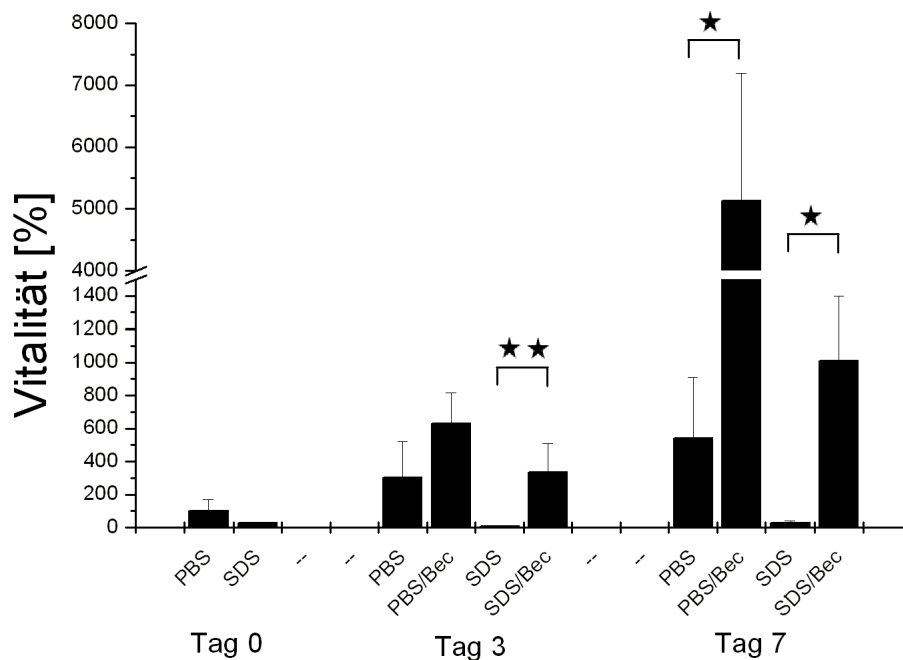


Abb. 4.17: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Becaplermin-Studie bei Auswertung über ATP-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Verumgruppen (Bec) behandelt mit 0,01 %-igem Hydrogel, n=4 für jeden Datenpunkt, (*) = $P < 0,05$; (**) = $P < 0,001$.

tumsfaktors deutlich feststellen: Das Auftragen des wirkstoffhaltigen Hydrogels rief einen Anstieg in der Vitalität hervor. Die Unterschiede zwischen Verum- und Placebobehandlung erreichten jeweils die Signifikanzschwelle, so dass mittels MTT-Assay die regenerative Wirkung der Modellzubereitung abgebildet werden konnte. Im Vergleich zu Tag 3 stiegen die Vitalitätswerte um etwa den Faktor vier für die nichttraumatisierten Konstrukte bzw. den Faktor 2,4 für traumatisierte Konstrukte. Demgegenüber war in den korrespondierenden Placebogruppen nur eine leichte Zunahme (ohne SDS) bzw. eine Vitalitätsabnahme (nach SDS-Inkubation) zu verzeichnen.

4.6.4.2 ATP-Test

Auch in diesem Falle wurde die Modellarzneistoffzubereitung einem zweiten Testverfahren unterzogen. Die zugehörigen Resultate sind in der Abbildung 4.17 und der Tabelle 4.9 ausgewiesen.

Trotz einer stärker als intendiert hervorgerufenen Traumatisierung (73 % Vitalitätsabnahme durch SDS-Inkubation) war der Unterschied zur nichttraumatisierten Gruppe am Beginn der Studie (Tag 0) nicht signifikant, da in der Kontrollgruppe eine erhöhte Stan-

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|------------|-------------|
| PBS | 100±69 | 303±217 | 541±367 |
| PBS/Verum | | 631±184 | 5136±2054 * |
| SDS | 27±4 | 7±2 | 29±13 |
| SDS/Verum | | 335±176 ** | 1009±391 * |

Tab. 4.9: Werteblatt zur Abbildung 4.17; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (*) = signifikant verschieden von der korrespondierenden Placebobehandlung; $P < 0,05$; (**) = hochsignifikant verschieden von der korrespondierenden Placebobehandlung; $P < 0,001$.

dardabweichung gemessen worden war. Von der Validität der Resultate war dennoch auszugehen, da sich über die Studie hinweg zwischen unterschiedlichen Behandlungsarmen, insbesondere zwischen den beiden stark durch SDS geschädigten Studiengruppen (SDS bzw. SDS/Verum) statistisch differenzieren ließ.

Für die nicht traumatisierte und nur mit Placebo behandelte Kontrollgruppe stellte sich eine Vitalitätsentwicklung ein, die über sieben Tage hinweg deutlich ansteigende Tendenz aufwies. Trotz Verwendung gleicher Chargen stellte sich daher zwischen MTT- und ATP-Test ein leicht differierendes Bild ein. Zwar bilden MTT- und ATP-Assay differierende Stoffwechselwege ab, weshalb ein identisches Ergebnis nicht erwartet werden konnte. Dennoch unterschied sich die hier dargestellte Tendenz auch von dem Verlauf der Vitalität der Kontrollgruppe in der Dexpanthenol-Gruppe, die über den ATP-Assay ausgewertet wurde (vgl. Abbildung 4.12). Neben unterschiedlichen Chargen wurden in beiden Gruppen jedoch auch unterschiedliche Kultivierungen als Placebo-Behandlung definiert, so dass sich nicht nur ein chargenbezogener Effekt, sondern auch ein studienbedingter Effekt postulieren ließ. Im Rahmen der Becaplermin-Studie wurde ein wirkstofffreies Hydrogel als Placebo definiert, während bei der Dexpanthenolgruppe kein Placebo-Gel zum Einsatz kam. In der letztgenannten Studie wurde vielmehr der Wirkstoff in das Medium eingebracht, so dass keinerlei Zubereitungsaufgabe auf die Oberfläche der Konstrukte erfolgt war.

Um auch diese Möglichkeit einer Beeinflussung der zeitabhängigen Vitalitätsverläufe evaluieren zu können, wurde der Faktor (wirkstofffreies Hydrogel) separat geprüft (vgl. Abschnitte 3.2.11.5 und 4.7.2).

Beim Vergleich der beiden nichttraumatisierten Verum- und Placebogruppen ergab sich nach drei Tagen ein nur tendenzieller, jedoch nach sieben Tagen signifikanter Unterschied durch den Auftrag von Becaplermin-Gel. Der proliferations- und vitalitätsfördernde Effekt des Wachstumsfaktors konnte deutlich erkannt werden, nachdem die Vitalität der

Hautäquivalente um das etwa 50-fache gegenüber Tag 0 angestiegen war.

Auch für die prätraumatisierten Gruppen ergaben sich Unterschiede zwischen Verum- und Placebobehandlung; hierbei wurde bereits nach drei Tagen ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt, der nach sieben Tagen immer noch als signifikant zu bezeichnen war. Die Gabe des Wachstumsfaktors Becaplermin als Gel führte zu einem etwa 37-fachen Anstieg der Vitalität traumatisierter Konstrukte bezogen auf den Stand nach Traumatisierung am Tag 0, so dass von einer ausgeprägten Regeneration zu sprechen war.

Die Vitalität der traumatisierten und nur mit Placebo behandelten Gruppe stieg nach einem Abfall auf nur noch 7 % der Ausgangsvitalität zum Tag sieben hin wieder auf 29 % an, was etwa dem Niveau direkt nach SDS-Behandlung entsprach. Auch dieser erneute Vitalitätsanstieg, der in der Dexpanthenol-Studie im ATP-Assay nicht festgestellt wurde, könnte neben Chargeneffekten auf unterschiedlich definierte Studienbedingungen zurückzuführen gewesen sein.

4.6.4.3 Histologische Analyse

Bei der Auswertung histologischer Schnittbilder von Hautäquivalenten, die zuvor mit Hydrogelen (wirkstoffhaltig oder wirkstofffrei) im Rahmen des Studiendesigns behandelt worden waren, stellte sich heraus, dass im Zuge der Präparierung das Epidermisäquivalent häufig von der Dermisunterlage großflächig abgetrennt oder abgerissen worden war. Zusammenhängend vollständige und damit der Auswertung zugängliche Abschnitte ließen sich regelmäßig nicht auffinden, so dass davon ausgegangen werden musste, dass durch den Auftrag von Zubereitungen wie halbfesten Gelen eine Erweichung und Auflockerung der Epidermis im Hautkonstrukt hervorgerufen wurde. Die für die folgenden Aufbereitungsschritte notwendige Stabilität war somit nicht mehr gegeben.

Ein repräsentatives Beispiel eines solchen Schnittbildes findet sich in der Abbildung 4.18.

4.6.4.4 Zwischenfazit

In der Becaplermin-Studie ließ sich mit einem zweiten Modellarzneistoff erneut das klinische Bild reproduzieren und am Regenerationsmodell *in vitro* nachweisen. Das Modell bewies seine Funktionstüchtigkeit damit auch für Zubereitungen aus Wirkstoffen und nicht nur für Wirkstoffbeimischungen zum Medium. Allerdings entfiel dabei die Möglichkeit die Ergebnisse der zellbasierten Assays mit der Histologie zu korrelieren.

Beide zellulären Assays zeigten qualitativ ähnliche Resultate auf, jedoch war es mit dem ATP-Assay möglich in der traumatisierten Gruppe bereits nach drei Tagen den aufge-

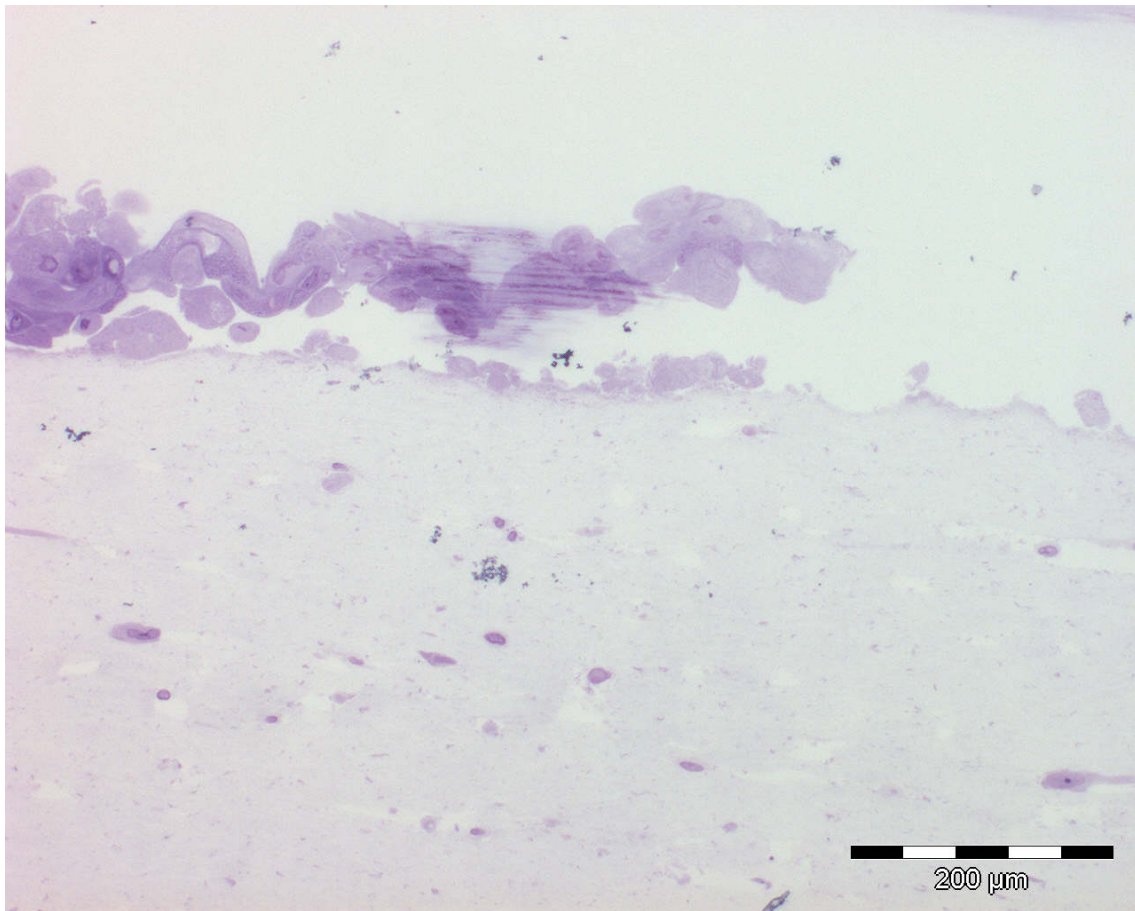


Abb. 4.18: Mit Toluidinblau eingefärbter Schnitt durch ein mit Becaplermin-Hydrogel behandeltes Hautkonstrukt ohne vorangegangene Traumatisierung am Tag 7.

tretenen Effekt statistisch abzusichern, während der MTT-Assay erst später reagierte. Nach sieben Tagen zeigten sich sowohl für traumatisierte als auch für nicht traumatisierte Hautkonstrukte deutliche Effekte, die auf die starke Wirksamkeit des Becaplermins als Wachstumsfaktor zurückzuführen waren, so dass im Unterschied zur Dexpanthenol-Studie eine Prätraumatisierung nicht zwingend notwendig war. Um auch weniger stark ausgeprägte Effekte evaluieren zu können, erschien die Prätraumatisierung dennoch sinnvoll. Hierfür sprach auch, dass signifikante Unterschiede in der Becaplermin-Studie nur dann bereits frühzeitig ausweisbar waren, wenn - wie im ATP-Assay geschehen - zuvor eine Inkubation mit SDS stattgefunden hatte.

4.7 Evaluierung von Wirkstoffen und Wirkstoffzubereitungen am Regenerationsmodell

Nach der Evaluation des Regenerationsmodells durch Wirkstoffe bzw. Wirkstoffzubereitungen mit bekannten regenerationsfördernden Effekten schloss sich die Evaluation von Wirkstoffen bzw. Zubereitungen an, von denen mangels zugelassener Indikation unbekannt war, ob entsprechende Effekte in vivo vorliegen könnten. Hiermit sollten erste Schritte unternommen werden, die das vorgeschlagene Modell anwendeten um entsprechende Daten in vitro erzeugen zu können.

4.7.1 Epoetin beta-Studie

Die Motivation zur Untersuchung von Epoetin beta ergab sich aus Literaturberichten, die positive Effekte des Wirkstoffs auf die Abheilung von Brandwunden postuliert hatten, während sich in dieser Indikation noch kein zugelassenes Arzneimittel im Markt befand (vgl. hierzu Abschnitt 2.3.3).

4.7.1.1 MTT-Test

Die Resultate des MTT-Tests sind in Abbildung 4.19 und Tabelle 4.10 ausgewiesen. Erfolgreich verlief erneut die Traumatisierung des Hautkonstruktes durch die Gabe von Natriumlaurylsulfat, was in einem Verlust von 59 % der Ausgangsvitalität am Tag 0 resultierte. Damit wurde das Konstrukt etwas stärker beeinträchtigt als es durch die SDS-Konzentration beabsichtigt war. Nach einem initialen tendentiellen Anstieg der Vitalitätswerte für die Kontrollgruppe (weder traumatisiert noch behandelt) fiel die Vitalität - ebenfalls tendentiell - wieder auf den Ausgangswert von Tag 0 zurück. Im Vergleich zu

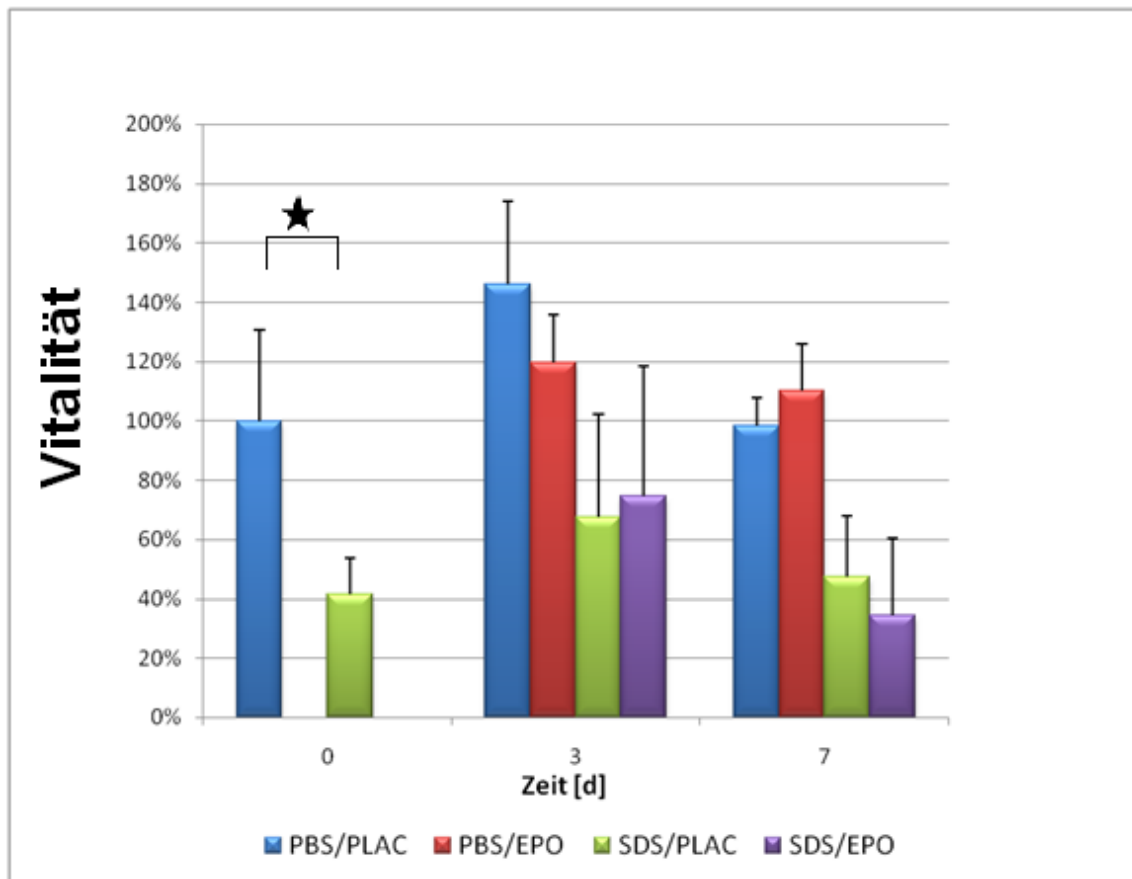


Abb. 4.19: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Epoetin-Studie bei Auswertung über MTT-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Placebogruppen (PLAC); Verumgruppen (EPO) behandelt mit 15 U Epoetin beta je ml Medium, n=4 für jeden Datenpunkt; (★) = $P < 0,05$.

denjenigen Konstruktchargen, die für den Alterungsstabilitätstest herangezogen worden waren (vgl. Abschnitt 4.6.2), war die Stabilität über sieben Tage in der hier untersuchten Charge weniger stark ausgeprägt.

Nahezu analog verlief die Vitalitätsentwicklung der nicht mit Epoetin beta behandelten, aber traumatisierten Hautäquivalentengruppe aus, die ebenfalls einen temporären Vitalitätsgipfel nach drei Tagen aufwies um danach erneut auf den Ausgangswert nach SDS-Inkubation am Tag 0 zurück zu fallen.

Vergleicht man nun die mit Epoetin behandelten Hautäquivalentengruppen mit den jeweils korrespondierenden Placebogruppen, so stellt man fest, dass sich die Vitalitätswerte der beiden Placebogruppen jeweils parallel zu den Verumgruppen entwickelt haben. Numerische Unterschiede in den jeweiligen Daten lagen im Bereich der Schwankungsbreite, so dass auch keine Tendenzen angegeben werden konnten. Zwischen den einander zugehörigen Placebo- und Verumarmen der Studie konnten somit keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|--------|--------|
| PBS | 100±31 | 146±29 | 98±9 |
| PBS/Verum | | 120±16 | 110±16 |
| SDS | 41±12 | 68±35 | 48±20 |
| SDS/Verum | | 75±44 | 35±26 |

Tab. 4.10: Werteblatt zur Abbildung 4.19; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0.

| Gruppe | Tag 0 | Tag 5 | Tag 7 |
|-------------|--------|--------|--------|
| PBS | 100±40 | 233±87 | 160±21 |
| PBS/Verum | | 257±96 | 169±42 |
| Diclo | 58±5 | 120±54 | 124±31 |
| Diclo/Verum | | 160±72 | 107±68 |

Tab. 4.11: Werteblatt zur Abbildung 4.20; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (Diclo) = Diclofenac-Natrium.

Um auszuschließen, dass lediglich aufgrund des gewählten Traumatisierungsweges über das Tensid Natriumlaurylsulfat kein regenerativer Effekt nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich eine weitere Testreihe angeschlossen, in welcher die Traumatisierung durch die Inkubation mit einer Lösung von Diclofenac-Natrium erfolgte; die Vitalität nahm bei diesem Traumatisierungsweg in der vorliegenden Hautkonstruktcharge um etwa 42 % ab; die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.20 und im zugehörigen Werteblatt 4.11 zusammengefasst. Als Konzentration der Diclofenac-Natrium-Lösung wurden nach einer vorangehenden Zytotoxizitätsbestimmung 800 mg/ml vorgewählt.

Für den Verlauf der weder traumatisierten noch behandelten Kontrollgruppe ergaben sich entsprechend Abbildung 4.20 qualitativ ähnliche zeitliche Veränderungen wie bei der SDS-Traumatisierung. Auch die Reduktion der Vitalität der traumatisierten Konstrukte auf etwa 50 % des Ausgangswertes wurde von den Konstrukten relativ gut überstanden, da sie bereits nach fünf Tagen Vitalitätswerte von leicht oberhalb 100 % des Ausgangswertes nicht traumatisierter Konstrukte einnahmen und auf diesem Niveau bis zum Tag 7 verblieben.

In Übereinstimmung mit den zuvor dargelegten Daten für die SDS-Traumatisierung ist auch hier festzustellen, dass für die Epoetin beta-Behandlung keinerlei Nutzen durch den Testassay wiedergegeben werden konnte, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den korrespondierenden Placebo- und Verumgruppen nachweisen ließen. Ein

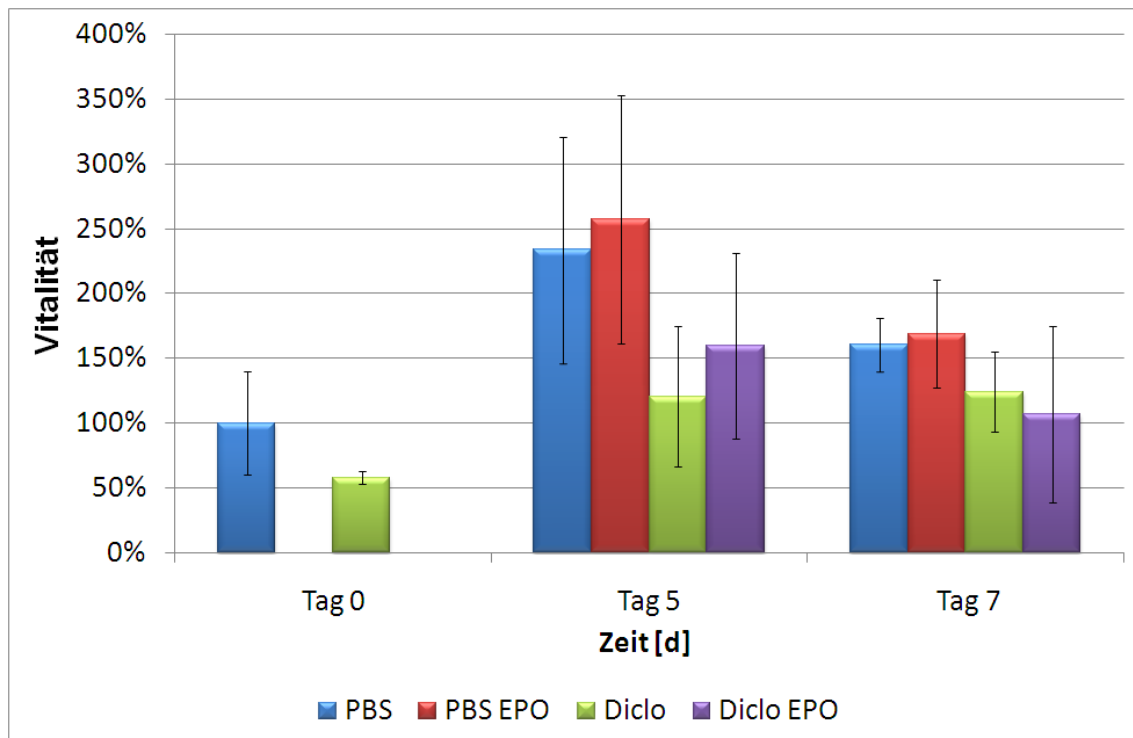


Abb. 4.20: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Epoetin-Studie bei Traumatisierung durch Diclofenac-Natrium, Auswertung über MTT-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit Diclofenac-Natrium (Diclo); Verumgruppen (EPO) behandelt mit 15 U Epoetin beta je ml Medium, n=4 für jeden Datenpunkt.

toxischer Effekt der gewählten Epoetin beta-Konzentration erschien jedoch ebenfalls unwahrscheinlich.

4.7.1.2 ATP-Test

Die Ergebnisse der Epoetin beta-Versuchsreihe nach Traumatisierung mit Natriumlaurylsulfat können der Abbildung 4.21 sowie der Tabelle 4.12 entnommen werden. Analog zur mit dem MTT-Assay ausgewerteten Versuchsreihe fand eine Wiederholung der Versuche nach Traumatisierung mit Diclofenac-Natrium statt; diese Versuchsergebnisse sind in der Abbildung 4.22 sowie in der zugehörigen Tabelle 4.13 ausgewiesen.

Im ersten experimentellen Versuchsaufbau, der eine Inkubation der für die Traumatisierung ausgewählten Gruppen durch SDS vorsah, ließ sich für die Kontrollgruppe beobachten, dass trotz Verwendung derselben Charge wie zur Erzielung der in Abbildung 4.19 dargestellten und mittels MTT erhobenen Daten unterschiedliche Vitalitäts-Zeit-Verläufe aufgezeichnet wurden; für den ATP-Assay konnten tendenziell eher fallende Vitalitätswerte in der Kontrollgruppe gesehen werden, während im MTT-Assay ein zwischenzeitlicher Zuwachs auffiel. Offensichtlich war trotz des Abstellens der beiden Assays auf ähnliche

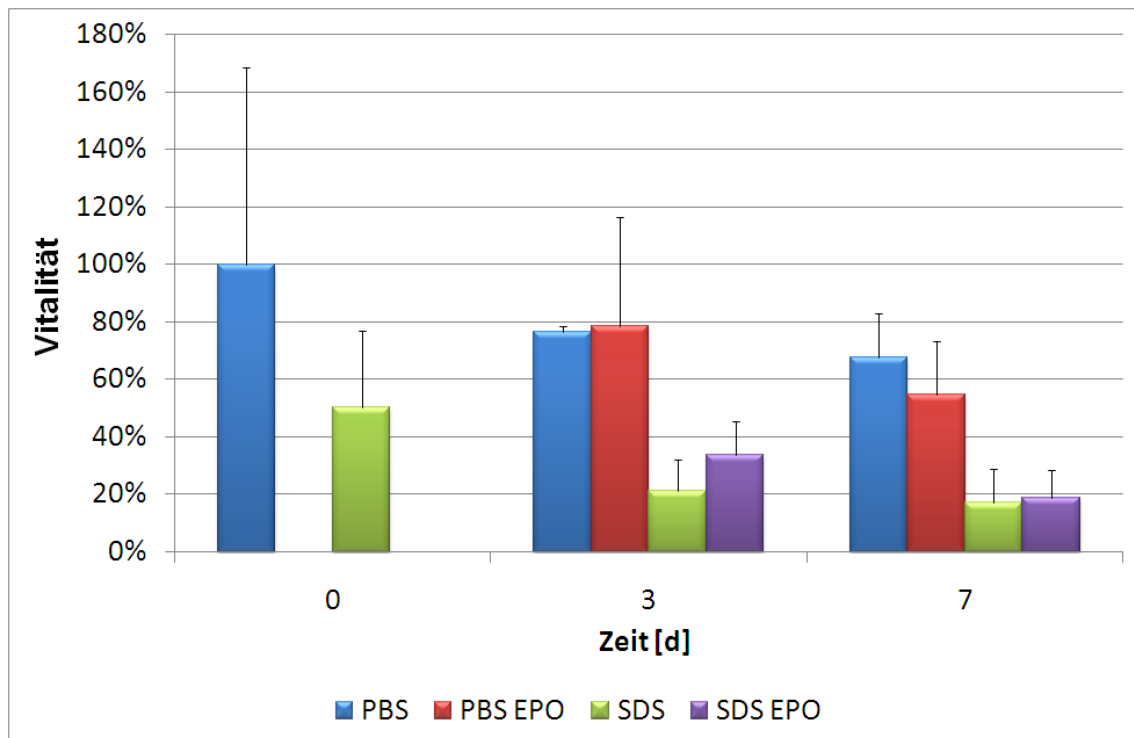


Abb. 4.21: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Epoetin-Studie bei Auswertung über ATP-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Verumgruppen (EPO) behandelt mit 15 U Epoetin beta je ml Medium, n=4 für jeden Datenpunkt.

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|-------|-------|
| PBS | 100±69 | 77±2 | 68±16 |
| PBS/Verum | | 79±38 | 55±19 |
| SDS | 50±27 | 21±11 | 17±12 |
| SDS/Verum | | 34±12 | 19±10 |

Tab. 4.12: Werteblatt zur Abbildung 4.21; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0.

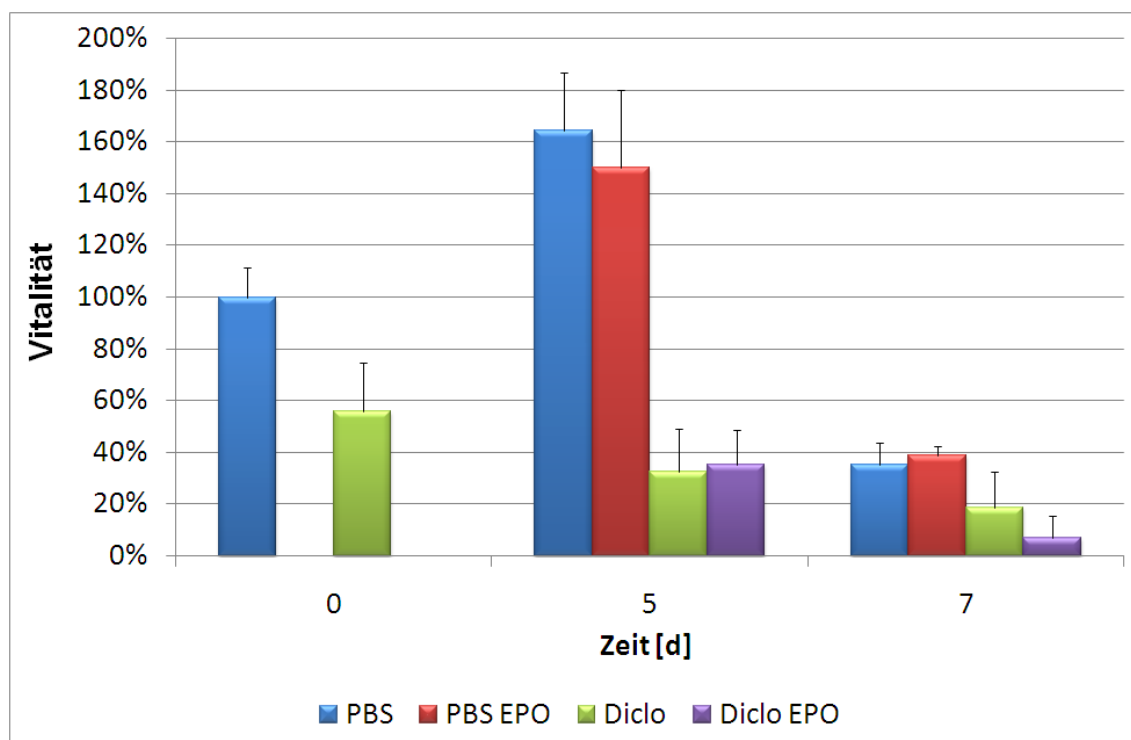


Abb. 4.22: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Epoetin-Studie bei Traumatisierung durch Diclofenac-Natrium, Auswertung über MTT-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit Diclofenac-Natrium (Diclo); Verumgruppen (EPO) behandelt mit 15 U Epoetin beta je ml Medium, n=4 für jeden Datenpunkt.

biochemische Targets ein unterschiedliches Messresultat ermittelbar, so dass nicht bedingungslos von dem Übereinstimmen beider Assays in quantitativer Hinsicht gesprochen werden konnte. Dennoch lieferten beide Assays insofern übereinstimmende qualitative Resultate, als sich die zusammengehörenden Placebo- und Verumgruppen auch im ATP-Assay durch parallel laufende Vitalitätswerte auszeichneten; somit konnte für Epoetin beta die fehlende Wirksamkeit im In-vitro-Assay auch mittels ATP-Test gezeigt werden. Wiederum gab es keine Anhaltspunkte, die für eine Toxizität der eingesetzten Wirkstoffmenge an Epoetin beta sprachen.

| Gruppe | Tag 0 | Tag 5 | Tag 7 |
|-------------|--------|--------|-------|
| PBS | 100±12 | 165±22 | 35±8 |
| PBS/Verum | | 150±30 | 39±4 |
| Diclo | 56±19 | 32±17 | 19±14 |
| Diclo/Verum | | 35±14 | 7±8 |

Tab. 4.13: Werteblatt zur Abbildung 4.22; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (Diclo) = Diclofenac-Natrium.

Wurde der experimentelle Versuchsaufbau wiederholt, jedoch mit Diclofenac-Natrium traumatisiert, konnten erneut keine Vorteile für Epoetin beta gezeigt werden. Die Placebo- und Verumgruppen unterschieden sich innerhalb des traumatisierten Studienarms sowie erwartungsgemäß auch innerhalb des nicht traumatisierten Studienarms nur geringfügig, so dass keine Signifikanz nachzuweisen war. Tendenziell zeigte sich für die traumatisierte und mit Epoetin beta behandelte Hautäquivalentgruppe ein Nachteil nach sieben Tagen gegenüber den nicht mit Arzneistoff in Kontakt gekommenen Hautäquivalenten; diese Tendenz war jedoch statistisch nicht signifikant und könnte aufgrund der vergleichsweise hohen Standardabweichung ein Zufallsfund sein.

4.7.1.3 Histologische Untersuchungen

Aufgrund des begrenzten Zugangs zu NeoRecormon konnten keine histologischen Analysen durchgeführt werden, nachdem eine größere Menge an Epoetin beta für die Reproduktion der Versuchsreihen mit Diclofenac-Natrium als traumatisierendem Agens sowie für orientierende Vorversuche benötigt worden war.

4.7.1.4 Zwischenfazit

Für Epoetin beta konnten keine schlüssigen Daten vorgelegt werden, die einen Vorteil gegenüber nicht mit Epoetin behandelten Hautäquivalenten zeigten, obwohl in der Literatur erste vielversprechende Ergebnisse aus in vivo-Untersuchungen publiziert wurden [133, 136]. Es stellte sich die Frage, ob das pharmakologische Target, dass in der klinischen Studie adressiert war, überhaupt im Hautäquivalent, das nur ein stark simplifiziertes Modell der Humanhaut darstellte, exprimiert war. In der neueren Literatur wird davon ausgegangen, dass Erythropoetin möglicherweise durch eine Beförderung der Neoangiogenese [137] oder durch eine Wirkung auf Haarfollikelzellen [138], die Erythropoetin auch selbst sezernieren können, eine Gewebsschutzwirkung entfaltet, die auch im Rahmen der Wundheilungsförderung komplizierter Hautwunden von Interesse sein könnte.

Da diese Targets im Hautäquivalent nicht exprimiert bzw. nicht funktionell enthalten sind, kann das übereinstimmend durch zwei Assays und durch Inkubation mit zwei unterschiedlichen Noxen in vitro erhaltene experimentelle Ergebnis erklärt werden. Da das gewählte Modell aus Fibroblasten, Keratinocyten und Kollagen nicht komplex genug war, um die mögliche pharmakologische Grundlage der Erythropoetin-Wirkung auf die Haut darzustellen, konnte nicht von einem positiven Resultat für Epoetin beta im In-vitro-Test ausgegangen werden.

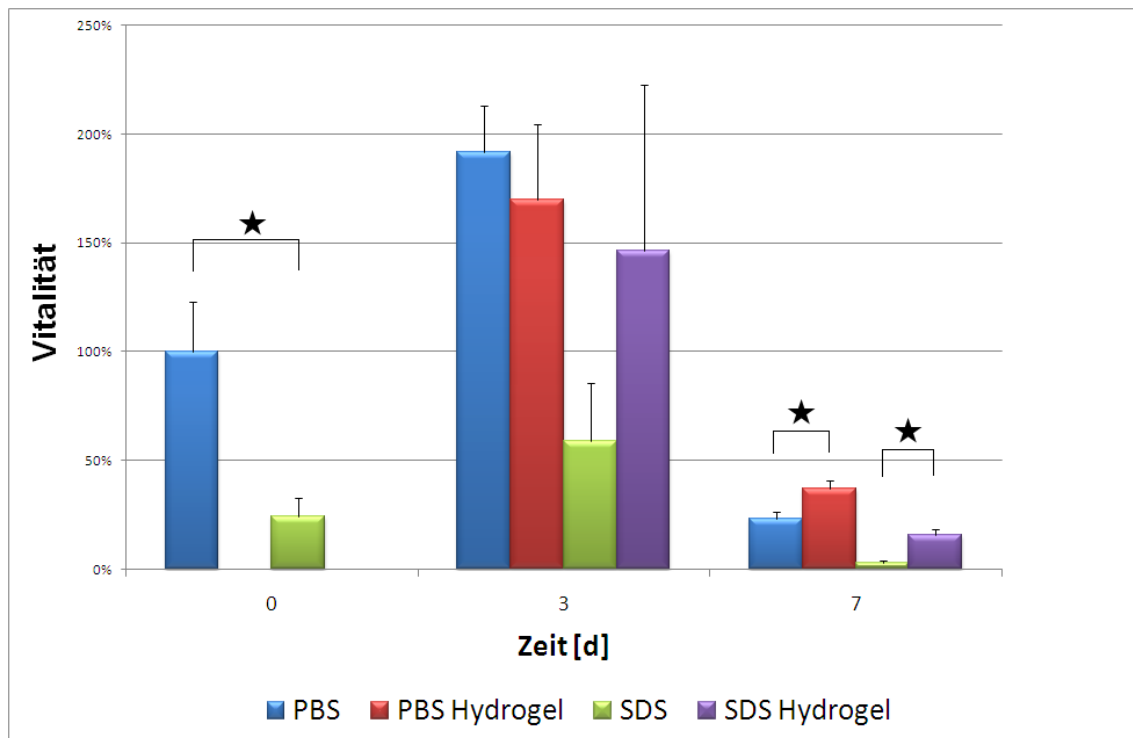


Abb. 4.23: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Hydrogel-Studie bei Auswertung über MTT-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Verumgruppen (Hydrogel) behandelt mit wirkstofffreiem Hydrogel, n=4 für jeden Datenpunkt, (★) = $P < 0,05$

4.7.2 Hydrogel-Studie

Die Motivation zur Durchführung einer Studie mit einem wirkstofffreien Hydrogel resultierte aus der Erkenntnis, dass in der nicht traumatisierten Placebo-Gruppe zur Becaplermin-Studie ein kontinuierlicher Vitalitätszuwachs im ATP-Assay festzuhalten war, der möglicherweise auf das Hydrogel, das dort als Placebo Verwendung fand, zurückzuführen war (vgl. Abschnitt 4.6.4.2).

4.7.2.1 MTT-Test

In dieser Untersuchung sollte ermittelt werden, ob auch ein wirkstofffreies Hydrogel in der Lage war, die Regeneration der Hautäquivalente zu befördern; hierzu wurde dieses nicht gegen eine andere Zubereitung bzw. ein Placebo, sondern gegen die Standardkultivierung ohne weitere Zusätze über sieben Tage geprüft. In Abbildung 4.23 und in der Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse für den MTT-Assay ausgewiesen.

Erneut wurde eine vergleichsweise starke Schädigung der zur Traumatisierung vorgesehenen Hautäquivalente ausgelöst, indem die Vitalität auf 24 % der Ausgangsvitalität herabgesetzt wurde, nachdem die Hautäquivalente SDS ausgesetzt worden waren. Den-

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|--------|--------|
| PBS | 100±23 | 192±22 | 23±3 |
| PBS/Verum | | 170±35 | 37±4 * |
| SDS | 24±8 | 59±27 | 3±1 |
| SDS/Verum | | 147±76 | 16±3 * |

Tab. 4.14: Werteblatt zur Abbildung 4.23; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (*) = signifikant verschieden von der korrespondierenden Placebobehandlung; $P < 0,05$.

noch konnte nach drei Tagen bereits wieder ein Anstieg in der Vitalität erkannt werden, so dass die starke Schädigung des Konstruktes nicht als unmittelbar letal anzusehen war.

Für die nicht mit SDS traumatisierten Hautäquivalente war bei der hier genutzten Charge erneut der Trend festzustellen, dass die Vitalität nach einem zwischenzeitlichen Anstieg am dritten Tag zu Tag 7 hin wieder deutlich abfiel. Am siebten Tag war bei der mit Hydrogel versehenen Probe schließlich ein weniger starker Vitalitätsabfall zu erkennen als bei der Kontrollgruppe; dieser Unterschied erreichte die Signifikanzschwelle. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Betrachtung derjenigen Gruppen, die zuvor mit SDS in Kontakt gekommen waren; hier fanden sich nach drei Tagen bereits erste, jedoch noch nicht signifikante Hinweise für eine positive Wirkung des Hydrogels, bevor am letzten Tag der Studie ein deutlicher Vorteil resultierte. Hier konnten die Unterschiede zwischen Behandlung mit und ohne Hydrogel als signifikant klassifiziert werden, da die für traumatisierte und nicht behandelte Konstrukte gemessene Vitalität ein nahezu vollständiges Absterben dieser Gruppe nahelegte.

4.7.2.2 ATP-Test

Auch in diesem experimentellen Versuchsaufbau wurden die Effekte durch den zweiten Assay mittels ATP-Messung abgeprüft, um die Versuchsergebnisse auf eine breitere Basis stellen zu können. Diese Ergebnisse lassen sich Abbildung 4.24 und Tabelle 4.15 entnehmen.

Überraschend fiel der initiale Vitalitätsabfall durch SDS-Inkubation im ATP-Test weniger stark aus als bei dem unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchsaufbau im MTT-Test. Dieses Resultat zeigte erneut, dass beide Assays nicht zwangsläufig zu identischen quantitativen Aussagen führen müssen.

Aufgrund der eingangs geschilderten Überlegung, dass der kontinuierliche Vitalitätszuwachs im ATP-Assay in der nicht traumatisierten Placebohydrogel-Gruppe zur Becapler-

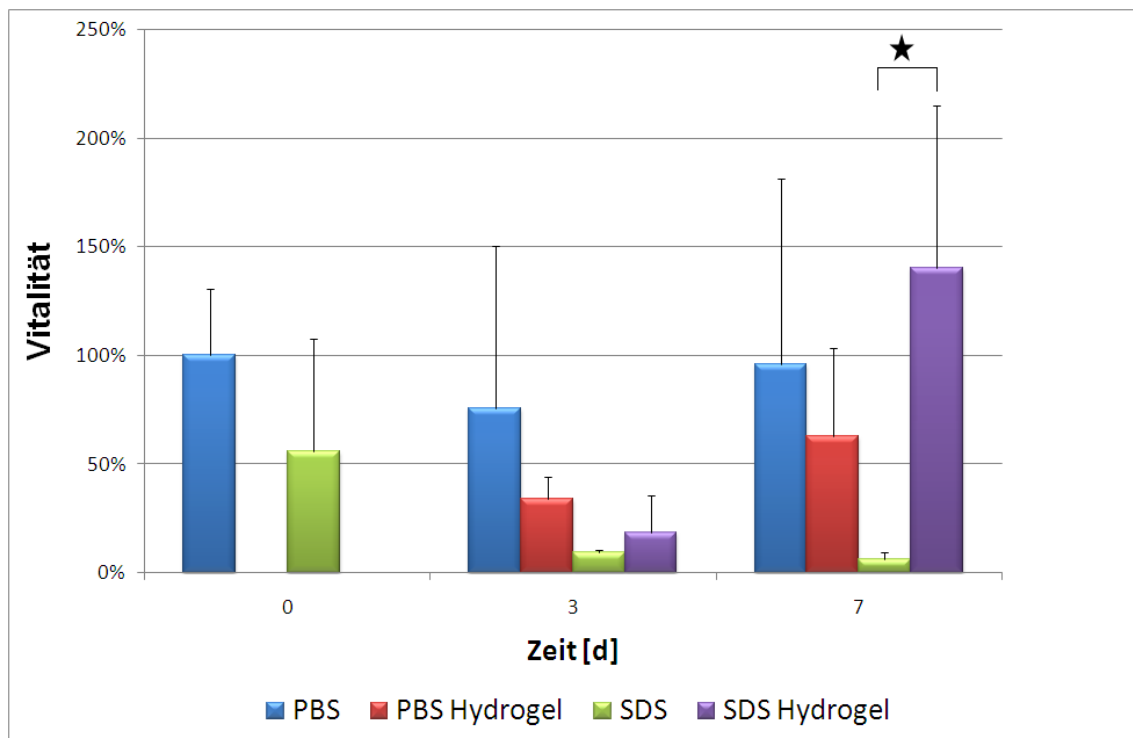


Abb. 4.24: Zeitlicher Verlauf der Vitalität in der Hydrogel-Studie bei Auswertung über ATP-Assay. Keine Vortraumatisierung (PBS), Vortraumatisierung mit SDS (SDS); Verumgruppen (Hydrogel) behandelt mit wirkstofffreiem Hydrogel, n=4 für jeden Datenpunkt, (★) = $P < 0,05$

| Gruppe | Tag 0 | Tag 3 | Tag 7 |
|-----------|--------|-------|---------|
| PBS | 100±30 | 76±75 | 96±86 |
| PBS/Verum | | 34±10 | 63±41 |
| SDS | 56±52 | 9±1 | 6±3 |
| SDS/Verum | | 18±17 | 141±74★ |

Tab. 4.15: Werteblatt zur Abbildung 4.24; alle Angaben in [%] bezogen auf den Ausgangswert der nicht traumatisierten Kontrollgruppe an Tag 0; (★) = signifikant verschieden von der korrespondierenden Placebobehandlung; $P < 0,05$.

min-Studie auf das dort eingesetzte wirkstofffreie Hydrogel zurückzuführen sein könnte (vgl. Abschnitt 4.6.4.2), kam es zur Durchführung der hier vorgestellten Hydrogelstudie. Betrachtete man nun jedoch die entsprechende Gruppe (keine Schädigung und Behandlung mit Hydrogel = Verum im Rahmen dieser Untersuchung), so ergab sich, das ausgehend von 100 % Vitalität an Tag 0 die Vitalität zunächst auf 34 % abfiel um dann erneut auf 63 % anzusteigen. Im Ergebnis stellte dies ein weiteres Indiz dar, das gegen den direkten Vergleich von mit unterschiedlichen Chargen erhobenen Daten sprach und die Bearbeitung von Fragestellungen an einer definierten Hautäquivalent-Charge erforderte. Dies galt vor allem im Hinblick auf quantitative Ereignisse und zeitliche Veränderungen der Vitalität.

Im konkreten Ergebnis der hier ausgewerteten Versuchsreihe konnte das Hydrogel keinen Vorteil für das Hautkonstrukt erzeugen, wenn keine Traumatisierung gesetzt worden war. Tendenziell bestand sogar eher ein Nachteil, der allerdings in der Standardabweichung unterging. Ein anderes Bild ließ sich zeichnen, wenn die traumatisierten Hautäquivalentgruppen verglichen wurden. Ein noch nicht signifikanter Unterschied nach drei Tagen ging zum Ende der Untersuchung hin in einen statistisch nachweisbaren Effekt über, d. h. ein Nutzen für den Auftrag von Hydrogel ließ sich ermitteln.

4.7.2.3 Zwischenfazit

Aufgrund des halbfesten Charakters der als Verum eingesetzten wirkstofffreien Hydrogelzubereitung wurde nach den Erfahrungen mit dem Becaplermin-Hydrogel auf die Anfertigung histologischer Schnittbilder verzichtet, da bekannt war, dass durch den Auftrag des Hydrogels ein Abreißen der Epidermis von der Kollagenunterlage möglich war.

Aus den Daten der beiden zellbasierten Assays ließ sich schließen, dass der Auftrag eines wirkstofffreien Hydrogels im Sinne eines feuchten Wundverschlusses die Regeneration begünstigte, sofern ein Trauma gesetzt worden war. Welche Konsequenzen dies auf histologischer Ebene nach sich zog, konnte aufgrund der präparativen Grenzen nicht ermittelt werden. Ob das Auftragen des Gels auch für intakte Konstrukte einen Vorteil hatte, konnte nicht abschließend einer Klärung zugeführt werden, da nur in einem der beiden Assays die Signifikanzschranke überwunden worden war.

Kapitel 5

Abschlussdiskussion

5.1 Monolayer als Screeningmethoden

Simplifizierte Zellkulturmodelle zum leichten und schnellen Screening von Parametern werden dann bevorzugt verwendet, wenn sie reproduzierbare Ergebnisse liefern, die auf die Situation in vivo zurückschließen lassen. Je einfacher der Aufbau der Konstrukte ist, umso weniger Aufwand und Kosten sind mit der Herstellung verbunden, umso eher besteht jedoch die Gefahr funktionelle Mechanismen, die für die Übertragbarkeit auf das in vivo-Geschehen essentiell sind, aus dem Modell auszuschließen. So besteht z. B. ein Crosstalk zwischen Keratinocyten und Fibroblasten über parakrine Mechanismen, in dessen Folge Keratinocyten Signale an Fibroblasten aussenden können, deren Rückwirkung die Keratinocyten dann wieder zur Teilung anregen kann [42, 139].

Der erhöhte Ressourceneinsatz und Kostenaufwand, der durch ein komplexeres Modell bedingt wird, muss andererseits in einer akzeptablen Balance zur interessierenden Fragestellung stehen, indem z. B. die Betrachtung ethischer Aspekte wie die Vermeidung von Tierversuchen [1, 79] ermöglicht wird. Hinzu kommt, dass das komplexere Modell diese Komplexität rechtfertigen muss, indem es die korrektere Abbildung von in vivo vorliegenden Gesetzmäßigkeiten in vitro ermöglicht. Andernfalls wird der zusätzliche Faktor wieder aus dem Modell entfernt, wie z. B. der Einbau einer Sebozytenzelllinie in das organotypische Hautäquivalent, nachdem das intendierte Ziel nicht erreicht worden ist [11].

Daher war im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu prüfen, ob die Notwendigkeit bestand das komplexere und kostenintensiver zu kultivierende Modell „organotypisches Hautäquivalent“ zu verwenden um in vitro therapeutische Optionen zur Wundheilungsförderung evaluieren zu können, oder ob eine praktikablere Option dargestellt hätte auf leicht kultivierbare Monolayer zurückzugreifen.

Die Monolayer der im Hautäquivalent organisierten Zellarten HaCaT und HDF zeigten in den Fällen der chemischen Traumatisierung mit einem Arzneistoff sowie zweier Tenside keine Anzeichen für Regeneration nach Verwendung des Modellarzneistoffs Dexpanthenol. Damit war es trotz Dosismodifikation und Betrachten zweier unterschiedlicher Zellarten nicht möglich die in vivo herrschenden Verhältnisse abzubilden. Für Monolayerkulturen von Fibroblasten und immortalisierten Keratinocyten stellten sich damit andere Resultate ein als für die Jurkat-Zelllinie, die nach Literaturangaben auf Dexpanthenol-supplementation mit erhöhten ATP- und auch Glutathionspiegeln reagierte [46].

Auch ein in der Literatur vorgeschlagenes Wundheilungsmodell, das für Kokultivate entwickelt worden war, ließ sich nicht auf Zellen der Dermis oder Epidermis übertragen [75]; in dieser Arbeit von Grossman et al. war in Kokultivaten die Traumatisierung durch ein sogenanntes „serum starving“, den abrupten und zeitlich definierten Entzug von Serum aus dem Kulturmedium, gesetzt und die anschließende Regeneration in Folge von potentiell wundheilungsfördernden Speicheldrüsenextrakten evaluiert worden.

Daher erschien es plausibel, die Evaluation regenerativer Wirkstoffe und Wirkstoffzubereitungen im komplexeren Modell der organotypischen Hautäquivalente vorzunehmen. Einschränkend muss gesagt werden, dass der fehlende Nachweis regenerativer Eigenschaften von Dexpanthenol nur für die vier hier vorgenommenen Traumatisierungswege gilt. Namentlich wurden hierzu Natriumlaurylsulfat, Cetrimid, Diclofenac-Natrium und das „serum starving“ eingesetzt. Es existieren Berichte, dass nach Traumatisierung eines Monolayers durch partielles Abstreifen („Scratching“) Dexpanthenol regenerativ wirken kann [140]; dennoch bleibt das grundsätzliche Problem bestehen, dass sich Wirkstoffzubereitungen wie Salben, Cremes oder Gele zur topischen Applikation auf organotypischen Hautäquivalenten wegen der Möglichkeit des direkten Auftrags besser evaluieren lassen als an submers kultivierten Monolayern.

5.2 Charakterisierung von Hautäquivalenten

Bevor ein neues Modell im Rahmen einer Publikation vorgeschlagen werden kann, ist es notwendig es einer intensiven Charakterisierung zu unterziehen. Für die organotypischen Hautäquivalente ist dies bereits auf vielen Feldern geschehen, so dass dies zu einer breiten Akzeptanz und auch zu Validierungsbemühungen geführt hat [9, 10, 78, 79, 85, 86, 132]. Im Rahmen der hier vorgeschlagenen modifizierten Variante eines miniaturisierten Hautäquivalentes, das mit geringerem Kostenaufwand herzustellen ist und sich besser für die Durchführung zellbasierter Assays eignet, konnten ähnliche morphologische Eigenschaften wie für die bisher beschriebenen Hautäquivalente aufgezeigt werden, so dass eine

Vergleichbarkeit in den übrigen Parametern wie Barriereeigenschaften des Epidermisäquivalentes nahe lag.

Für das organotypische Hautäquivalent konnte weiterhin über HPTLC nachgewiesen werden, dass eine Verstoffwechslung des Modellarzneistoffs Dexpanthenol, der ein Prodrug darstellt, möglich war und dass das Intermediat Pantothensäure wahrscheinlich in den intrazellulären Stoffwechsel einfluss. Dies stellte die Bedingung dar, ohne die das Hautäquivalent am Modellarzneistoff seine Eignung nicht hätte unter Beweis stellen können.

Zur Charakterisierung des Stoffwechselzustands eines Hautäquivalentes wurde der Anwendungsbereich eines zellulären Assays, der herstellerseitig für die Quantifizierung von ATP in Monolayern intendiert war, auf dreidimensionale Gewebeproben wie die Hautäquivalente ausgedehnt. Zur ATP-Quantifizierung war es erforderlich das intrazellulär vorliegende ATP durch Zellyse mittels oberflächenaktiven Substanzen, die im Assaycocktail vorhanden waren, der zur Lumineszenz führenden enzymatischen Reaktion zugänglich zu machen. Da die lytische Aktivität des Assays nicht ausreichte um den notwendigen raschen Aufschluss eines dreidimensionalen Gewebes vorzunehmen, konnte der Assay erst durch ein auf mechanischer Homogenisation des Gewebes basierendes Verfahren auch zur Charakterisierung von Hautkonstrukten erfolgreich eingesetzt werden. Der durch die Aufarbeitung in einer Schwingmühle entstehende Signalabfall wurde durch die Zugabe eines ATP-Standards kompensiert. Allerdings verlor der Assay durch die Aufarbeitung im Vergleich zu Versuchen an Monolayern einen Teil seiner analytischen Präzision, so dass bei der Analyse von Hautäquivalenten ähnliche Standardabweichungen entstanden, wie sie bei Anwendung des MTT-Tests in für Hautkonstrukten beschriebenen Versuchsanordnungen gemessen wurden [104]. Dennoch erschien die Absicherung der mit dem klassischen MTT-Assay erzielten Aussagen durch die Einbeziehung einer zweiten Methode zweckmäßig um eine höhere Aussagekraft zu erreichen.

5.3 Modellarzneistoffe: Evaluierung des Konzepts

Durch zwei Modellarzneistoffe sollte die Eignung des vorgeschlagenen Regenerationsmodells geprüft werden. Hierzu wurden Substanzen verwendet, deren klinische Wirksamkeit bereits bewiesen war und zu welchen sich entsprechende Fertigarzneimittel auf dem Markt befanden.

Der erste Arzneistoff, Dexpanthenol, erwies sich nach Einsatz verschiedener Konzentrationen im Bereich von 0,1 % als wirksam, so dass im prätraumatisierten Konstrukt regenerative Effekte in den beiden zellulären Assays gezeigt werden konnten, die sich

über eine histologische Analyse bestätigten. Auch für den zweiten Arzneistoff, das Becaplermin, das als Fertigarzneimittel in der Form einer Zubereitung Verwendung fand, ließen sich positive Effekte finden, wie sie auch in der Literatur für das Fertigarzneimittel zu finden waren [141]. Allerdings versagte das Modell bei der histologischen Aufbereitung von Material, das mit der Gelformulierung in Kontakt gekommen war.

Diskutiert man die Ergebnisse für die beiden Modellarzneistoffe, so erscheinen die Haut-äquivalente als Screeningmethode geeignet für die Evaluation potentiell regenerativer Behandlungsoptionen, da sie die Effekte von Becaplermin-Gel und Dexpanthenol in vitro korrekt abgebildet haben. Auch der vorgenommene Studienaufbau mit zwei chemisch vortraumatisierten Gruppen von insgesamt vier Studienarmen kann als sinnvoll angenommen werden, da einerseits Effekte eher mild wirkender Substanzen wie Dexpanthenol teilweise nur nach Traumatisierung entdeckt werden konnten und da andererseits Effekte eher stark wirkender Zubereitungen wie dem Becaplermin-Gel schon frühzeitig detektiert werden konnten. Für Substanzen, die dem Kultivierungsmedium beigemischt wurden, wie Dexpanthenol, konnte durch die Histologie eine zusätzliche Untermauerung der Ergebnisse geliefert werden.

Limitierend für den Einsatz des Modells sind nach den vorliegenden Ergebnissen die schwankenden Vitalitätsverläufe von Charge zu Charge. Vergleiche zwischen verschiedenen Assays sind daher nur innerhalb einer Charge von Hautkonstrukten möglich. Auch die beiden verwendeten Assays müssen nicht zwingend zu identischen Resultaten führen, so dass prinzipiell zwei Vitalitätsassays zur Erzielung einer sicheren Aussage verwendet werden sollten. Bei reinen Substanzprüfungen bietet sich zusätzlich die histologische Abklärung als Kombinationspartner an.

Um am vorgeschlagenen Modell zu belastbaren Aussagen zu gelangen, empfiehlt sich weiterhin eine der Wirkstoffprüfung vorgelagerte Dosisfindungsstudie, damit der Arzneistoff mit solchen Dosierungen bzw. Konzentrationen im Modell geprüft werden kann, die für die Bedingungen in der Gewebeskultur angemessen erscheinen. Im Dexpanthenolversuch konnte gezeigt werden, dass von einer für die topische Arzneimitteltherapie akzeptierten Konzentration von 5 % nicht unmittelbar auf die ideale Konzentration für die Mediensupplementation geschlossen werden konnte, sondern diese bei 0,1 % Dexpanthenol anzusetzen war, sofern kein hypotones Medium eingesetzt worden war.

5.4 Evaluation neuer Therapieoptionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Therapieoptionen abgeprüft, deren wundheilungsförderndes Potential nicht abschließend geklärt war. In der Prüfung des durch die Litera-

tur bereits als therapeutische Maßnahme für schlecht heilende Wunden besprochene Erythropoetins bzw. Epoetin beta [133] wurde jedoch nach Ausbleiben von In-vitro-Effekten unter Einsatz zweier unterschiedlicher Traumatisierungswege eine weitere Limitierung für den Einsatz des Wundheilungsmodells gefunden, da das vermutliche pharmakologische Target nicht im simplifizierten Hautmodell enthalten war. Darüber hinaus besteht gerade bei noch nicht in die Therapie eingeführten Arzneistoffen das Risiko nicht im korrekten Dosisbereich zu arbeiten. Dieses Risiko konnte nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Im Falle der Evaluation des Hydrogels zeigte sich erneut die Notwendigkeit der Testung an einer Konstruktcharge, da die Ergebnisse qualitativ nicht mit denjenigen früherer Daten aus der Becaplerminstudie in Einklang zu bringen waren. Interessant wäre in diesem Zusammenhang ein tieferer Einblick in die intrazellulären Vorgänge im organotypischen Hautkonstrukt. Nach Durchsicht der Literatur scheint sich hier für Folgearbeiten insbesondere die Immunhistochemie oder die quantitative RT-PCR anzubieten, mit deren Hilfe z. B. über mRNA-Quantifizierung die Aktivität von an der Wundheilung beteiligten Genen bzw. Enzymen gemessen werden könnte [142, 143, 144, 145].

Kapitel 6

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation und Charakterisierung eines Modells zur Nachbildung regenerativer Effekte von Arzneistoffen und topischen Arzneistoffzubereitungen in vivo.

Nachdem die zu Beginn der Arbeit evaluierten Monolayer auf der Basis von humanen immortalisierten Keratinocyten und humanen dermalen Fibroblasten sich als nicht geeignet erwiesen Effekte eines Modellarzneistoffs in vitro abzubilden, wurde das organotypische Hautäquivalent näher charakterisiert um als Regenerationsmodell zu dienen.

Hierzu wurden zwei zelluläre Assays eingesetzt. Neben dem klassischen MTT-Test wurde ein die ATP-Konzentration messender Lumineszenzassay eingesetzt, der für die Anwendung an einem dreidimensionalen Gewebe zuvor adaptiert werden musste. Hierzu war es erforderlich ein im Vergleich zu früheren Arbeiten [9, 11, 13] miniaturisiertes organotypisches Hautäquivalent zu entwickeln. Dieses zeichnete sich durch eine vergleichbare Morphologie aus, wie z. B. den mehrschichtigen Aufbau eines Epidermisäquivalentes mit teilweiser Differenzierung der beteiligten Keratinocyten. Als zusätzliche Methode zur Auswertung des Regenerationsmodells wurde eine histologische Analyse aufgenommen.

Im Rahmen von vierarmigen Studien, die das Setzen oder das Auslassen einer chemischen Vortraumatisierung sowie die anschließende Behandlung mit einem Verum oder einem Placebo kombinierten, wurden zunächst zwei Modellarzneistoffe, Dexpanthenol sowie Becaplermin (als Gel), über eine Woche mit Probenzügen an den Tagen 0, 3 und 7 geprüft, bevor auch Epoetin beta und ein wirkstofffreies Hydrogel untersucht wurden. Nachdem das Regenerationsmodell die in vivo auftretenden wundheilungsfördernden Eigenschaften von Dexpanthenol und Becaplermin in vitro abbilden konnte und auch die Metabolisierung des Prodrugs Dexpanthenol als gesichert gelten konnte, konnte von der prinzipiellen Eignung der Methode ausgegangen werden.

Die Studien mit Epoetin beta und einem wirkstofffreien Hydrogel machten deutlich, dass wie bei anderen Modellen auch bestimmte Limitierungen bestehen, die die Aussagekraft des Modells begrenzen. Sofern Fragestellungen stets im Rahmen einer einzelnen Charge von organotypischen Hautäquivalenten geprüft werden können und sofern davon ausgegangen werden kann, dass sich die pharmakologische Zielstruktur des zu prüfenden Wirkstoffs auch im simplifizierten Regenerationsmodell wiederfindet, kann das organotypische Hautkonstrukt als interessantes Screeningwerkzeug dienen, dessen Aussagekraft - sofern keine Wirkstoffzubereitungen eingesetzt werden - durch ergänzende histologische Untersuchungen gestützt werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] SCHÄFER-KORTING, Monika ; BOCK, Udo ; GAMER, Armin ; HABERLAND, Annekathrin ; HALTNER-UKOMADU, Eleonore ; KACA, Monika ; KAMP, Henricke ; KIETZMANN, Manfred ; KORTING, Hans C. ; KRÄCHTER, Hans-Udo ; LEHR, Claus-Michael ; LIEBSCH, Manfred ; MEHLING, Annette ; NETZLAFF, Frank ; NIEDORF, Frank ; RÜBBELKE, Maria K. ; SCHÄFER, Ulrich ; SCHMIDT, Elisabeth ; SCHREIBER, Sylvia ; SCHRÖDER, Klaus-Rudolf ; SPIELMANN, Horst ; VUIA, Alexander: Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: results of the German prevalidation study. In: *Altern Lab Anim* 34 (2006), Jun, Nr. 3, S. 283–294
- [2] REICHL, S.: *Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen*, Technische Universität Braunschweig, Diss., 2003
- [3] MEYER, L. ; BEDNARZ, J. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C. ; REICHL, S.: [Esterase activity of human organotypic cornea construct (HCC) as in vitro model for permeation studies]. In: *Ophthalmologe* 102 (2005), Oct, Nr. 10, S. 971–980
- [4] REICHL, S. ; BEDNARZ, J. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. In: *Br J Ophthalmol* 88 (2004), Apr, Nr. 4, S. 560–565
- [5] REICHL, Stephan ; DÖHRING, Stefanie ; BEDNARZ, Jürgen ; MÜLLER-GOYMANN, Christel C.: Human cornea construct HCC-an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas. In: *Eur J Pharm Biopharm* 60 (2005), Jul, Nr. 2, S. 305–308
- [6] ATTAMA, Anthony A. ; REICHL, Stephan ; MÜLLER-GOYMANN, Christel C.: Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. In: *Int J Pharm* 355 (2008), May, Nr. 1-2, S. 307–313

- [7] VON VIETINGHOFF, A. ; REICHL, S.: Barrier properties of the immortalized human nasal epithelial cell line RPMI 2650 In: Proceedings DPhG Annual Meeting, 2007
- [8] SPECHT, C.: *Entwicklung organotypischer Hautäquivalente und ihre Testung auf Eignung für Permeationsuntersuchungen von Arzneistoffen aus dermalen Zubereitungen*, Technische Universität Braunschweig, Diss., 1999
- [9] SPECHT, C. ; STOYE, I. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies. In: *Eur J Pharm Biopharm* 46 (1998), Nov, Nr. 3, S. 273–278
- [10] HOFFMANN, C. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate. In: *Pharmazie* 60 (2005), May, Nr. 5, S. 350–353
- [11] HOFFMANN, C.: *Charakterisierung organotypischer Hautmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen*, Technische Universität Braunschweig, Diss., 2006
- [12] NIESNER, Raluca ; PEKER, Bülent ; SCHLÜSCHE, Peter ; GERICKE, Karl-Heinz ; HOFFMANN, Christine ; HAHNE, Dagmar ; MÜLLER-GOYMANN, Christel: 3D-resolved investigation of the pH gradient in artificial skin constructs by means of fluorescence lifetime imaging. In: *Pharm Res* 22 (2005), Jul, Nr. 7, S. 1079–1087
- [13] WASSERMANN, K. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Standardized cultivation of artificial skin constructs for drug permeation studies. In: *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 333, Suppl. 1 (2000), S. 34
- [14] PONEC, Maria: Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. In: *Adv Drug Deliv Rev* 54 Suppl 1 (2002), Nov, S. S19–S30
- [15] THEWS, G. ; MUTSCHLER, E. ; VAUPEL, P.: *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1999
- [16] *Kompendium Wunde und Wundheilung*. 1. Auflage. Paul Hartmann AG, 1998
- [17] BLACKSIN, Marcia F. ; HA, Doo-Hoe ; HAMEED, Meera ; AISNER, Seena: Superficial soft-tissue masses of the extremities. In: *Radiographics* 26 (2006), Nr. 5, S. 1289–1304
- [18] PROST-SQUARCIONI, Catherine: [Histology of skin and hair follicle]. In: *Med Sci (Paris)* 22 (2006), Feb, Nr. 2, S. 131–137

- [19] Kap. Structure and Function of Skin In: MONTEIRO-RIVIERE, N. A.: *Dermal absorption models in toxicology and pharmacology*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005, S. 1–20
- [20] FUCHS, Elaine: Scratching the surface of skin development. In: *Nature* 445 (2007), Feb, Nr. 7130, S. 834–842
- [21] PEREZ-MORENO, Mirna ; FUCHS, Elaine: Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. In: *Dev Cell* 11 (2006), Nov, Nr. 5, S. 601–612
- [22] WATT, Fiona M.: Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. In: *EMBO J* 21 (2002), Aug, Nr. 15, S. 3919–3926
- [23] MACKENZIE, I. C.: Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. In: *Nature* 226 (1970), May, Nr. 5246, S. 653–655
- [24] YAROSH, Daniel B.: Enhanced DNA repair of cyclobutane pyrimidine dimers changes the biological response to UV-B radiation. In: *Mutat Res* 509 (2002), Nov, Nr. 1-2, S. 221–226
- [25] KOLOSSA, S.: *Evaluierung der Effizienz von Aminolävulinsäure im Vergleich zu ihrer methylierten Form in der Photodynamischen Therapie des Basalzellkarzinoms der Haut*., Friedrich-Schiller-Universität Jena, Diss., 2006
- [26] HEMMINKI, Kari ; XU, Guogang ; KAUSE, Laura ; KOULU, Leena M. ; ZHAO, Chunyan ; JANSEN, Christer T.: Demonstration of UV-dimers in human skin DNA in situ 3 weeks after exposure. In: *Carcinogenesis* 23 (2002), Apr, Nr. 4, S. 605–609
- [27] PROKSCH, E.: Die Permeabilitätsbarriere der Epidermis und ihre Beeinflussung durch Detergentien und Lokaltherapeutika. In: *Ärztliche Kosmetologie* 19 (1989), S. 424–443
- [28] SCHLÜTER, Holger ; WEPF, Roger ; MOLL, Ingrid ; FRANKE, Werner W.: Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. In: *Eur J Cell Biol* 83 (2004), Dec, Nr. 11-12, S. 655–665
- [29] ELIAS, P. M.: The stratum corneum revisited. In: *J Dermatol* 23 (1996), Nov, Nr. 11, S. 756–758

- [30] ANDERSEN, L.: Cell junctions in squamous epithelium during wound healing in palatal mucosa of guinea pigs. In: *Scand J Dent Res* 88 (1980), Aug, Nr. 4, S. 328–339
- [31] ELIAS, P. M. ; FRIEND, D. S.: The permeability barrier in mammalian epidermis. In: *J Cell Biol* 65 (1975), Apr, Nr. 1, S. 180–191
- [32] NEUBERT, R. H. H. ; WOHLRAB, W. A. ; MARSCH, W. A.: *Dermatopharmazie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001
- [33] WEPF, R ; NEUBERT, RHH: Stratum corneum - Struktur und Morphologie einer hoch effizienten Barriere. In: *Pharm Ztg* 17 (2007), S. 1506–1513
- [34] KARSENTY, G. ; PARK, R. W.: Regulation of type I collagen genes expression. In: *Int Rev Immunol* 12 (1995), Nr. 2-4, S. 177–185
- [35] SORRELL, J. M. ; CAPLAN, Arnold I.: Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. In: *J Cell Sci* 117 (2004), Feb, Nr. Pt 5, S. 667–675
- [36] BAUMANN, L.: Skin ageing and its treatment. In: *J Pathol* 211 (2007), Jan, Nr. 2, S. 241–251
- [37] ILLOUZ, Y. G.: Study of subcutaneous fat. In: *Aesthetic Plast Surg* 14 (1990), Nr. 3, S. 165–177
- [38] MARTIN, P.: Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. In: *Science* 276 (1997), Apr, Nr. 5309, S. 75–81
- [39] SHEPHARD, Pierre ; MARTIN, Gail ; SMOLA-HESS, Sigrun ; BRUNNER, Georg ; KRIEG, Thomas ; SMOLA, Hans: Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. In: *Am J Pathol* 164 (2004), Jun, Nr. 6, S. 2055–2066
- [40] BRUSH, James ; LIPNICK, Scott L. ; PHILLIPS, Tiffany ; SITKO, John ; McDONALD, J. T. ; MCBRIDE, William H.: Molecular mechanisms of late normal tissue injury. In: *Semin Radiat Oncol* 17 (2007), Apr, Nr. 2, S. 121–130
- [41] LIMAT, Alain ; HUNZIKER, Thomas: Use of epidermal equivalents generated from follicular outer root sheath cells in vitro and for autologous grafting of chronic wounds. In: *Cells Tissues Organs* 172 (2002), Nr. 2, S. 79–85

- [42] MAAS-SZABOWSKI, N. ; SHIMOTOYODOME, A. ; FUSENIG, N. E.: Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. In: *J Cell Sci* 112 (Pt 12) (1999), Jun, S. 1843–1853
- [43] *Fachinformation Bepanthen Wund- und Heilsalbe, Rote Liste Service GmbH Frankfurt, www.fachinfo.de.* 2005
- [44] PUTET, G. ; GUY, B. ; SIRVENT, A. ; BONY, R. D. ; GIRARD, F.: Studie zur Wirksamkeit von Bepanthen Salbe in der Vorbeugung und Behandlung von Windeldermatitis bei Früh- und Neugeborenen. In: *Réalités Pédiatriques* 63 (2001), S. 33–38
- [45] EBNER, Fritz ; HELLER, Andreas ; RIPPKE, Frank ; TAUSCH, Irene: Topical use of dexpanthenol in skin disorders. In: *Am J Clin Dermatol* 3 (2002), Nr. 6, S. 427–433
- [46] SLYSHENKOV, Vyacheslav S. ; DYMKOWSKA, Dorota ; WOJTCZAK, Lech: Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. In: *FEBS Lett* 569 (2004), Jul, Nr. 1-3, S. 169–172
- [47] ISHAQUE, A. ; AL-RUBEAI, M.: Role of vitamins in determining apoptosis and extent of suppression by bcl-2 during hybridoma cell culture. In: *Apoptosis* 7 (2002), Jun, Nr. 3, S. 231–239
- [48] ABIKO, Y. ; TOMIKAWA, M. ; SHIMIZU, M.: Enzymatic conversion of panthenyl alcohol to pantothenic acid. In: *J Vitaminol Kyoto* 15 (1969), S. 59–69
- [49] STÜTTGEN, G. ; KRAUSE, H.: Die percutane Absorption von Tritium markiertem Panthenol bei Mensch und Tier. In: *Arch. f. Klin. Exp. Dermatol.* 209 (1960), S. 578–582
- [50] GEHRING, W. ; GLOOR, M.: Effect of topically applied dexpanthenol on epidermal barrier function and stratum corneum hydration. Results of a human in vivo study. In: *Arzneimittelforschung* 50 (2000), Jul, Nr. 7, S. 659–663
- [51] GULHAS, N. ; CANPOLAT, H. ; CICEK, M. ; YOLOGLU, S. ; TOGAL, T. ; DURMUS, M. ; ERSOY, M. O.: Dexpanthenol pastille and benzydamine hydrochloride spray for the prevention of post-operative sore throat. In: *Acta Anaesthesiol Scand* 51 (2007), Feb, Nr. 2, S. 239–243
- [52] PROKSCH, E. ; NISSEN, H. P.: Dexpanthenol enhances skin barrier repair and reduces inflammation after sodium lauryl sulphate-induced irritation. In: *The Journal of dermatological treatment* 13 (2002), S. 173–176

- [53] *Fachinformation Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Rote Liste Service GmbH Frankfurt, www.fachinfo.de. 2006*
- [54] *Fachinformation Regranex 0,01 Frankfurt, www.fachinfo.de. 2005*
- [55] STEED, D. L.: Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. In: *Clin Plast Surg* 25 (1998), Jul, Nr. 3, S. 397–405
- [56] ANSEL, J. C. ; TIESMAN, J. P. ; OLERUD, J. E. ; KRUEGER, J. G. ; KRANE, J. F. ; TARA, D. C. ; SHIPLEY, G. D. ; GILBERTSON, D. ; USUI, M. L. ; HART, C. E.: Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. In: *J Clin Invest* 92 (1993), Aug, Nr. 2, S. 671–678
- [57] YONEI, Nozomi ; KANAZAWA, Nobuo ; OHTANI, Toshio ; FURUKAWA, Fukumi ; YAMAMOTO, Yuki: Induction of PDGF-B in TCA-treated epidermal keratinocytes. In: *Arch Dermatol Res* 299 (2007), Nov, Nr. 9, S. 433–440
- [58] SENET, P.: [Becaplermin gel (Regranex gel)]. In: *Ann Dermatol Venereol* 131 (2004), Apr, Nr. 4, S. 351–358
- [59] D'HEMECOURT, P. A. ; SMIELL, J. M. ; KARIM, M. R.: Sodium Carboxymethylcellulose Aqueous-Based Gel vs. Becaplermin Gel in Patients with Nonhealing Lower Extremity Diabetic Ulcers. In: *Wounds* 10 (3) (1998), S. 69–75
- [60] PERRY, Barbara H. ; SAMPSON, Allan R. ; SCHWAB, Barry H. ; KARIM, M. R. ; SMIELL, Janice M.: A meta-analytic approach to an integrated summary of efficacy: a case study of becaplermin gel. In: *Control Clin Trials* 23 (2002), Aug, Nr. 4, S. 389–408
- [61] SABA, Amer A. ; FREEDMAN, Bruce M. ; GAFFIELD, James W. ; MACKAY, Donald R. ; EHRLICH, H. P.: Topical platelet-derived growth factor enhances wound closure in the absence of wound contraction: an experimental and clinical study. In: *Ann Plast Surg* 49 (2002), Jul, Nr. 1, S. 62–6; discussion 66
- [62] *Dear Healthcare Professional-Letter, Important drug warning regarding Regranex, Ortho-McNeil. 2008*
- [63] *Fachinformation NeoRecormon Patronen, Rote Liste Service GmbH Frankfurt, www.fachinfo.de. 2008*
- [64] *Europäisches Arzneibuch. Bd. 5 mit Nachträgen. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2005-2008*

- [65] GALEANO, Mariarosaria ; ALTAVILLA, Domenica ; BITTO, Alessandra ; MINUTOLI, Letteria ; CALÒ, Margherita ; CASCIO, Patrizia L. ; POLITO, Francesca ; GIUGLIANO, Giovanni ; SQUADRITO, Giovanni ; MIONI, Chiara ; GIULIANI, Daniela ; VENUTI, Francesco S. ; SQUADRITO, Francesco: Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. In: *Crit Care Med* 34 (2006), Apr, Nr. 4, S. 1139–1146
- [66] ALBERTS, Bruce ; JOHNSON, Alexander ; LEWIS, Julian ; RAFF, Martin ; ROBERTS, Keith ; WALTE, Peter: *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 2002
- [67] NAKAZAWA, K. ; KALASSY, M. ; SAHUC, F. ; COLLOMBEL, C. ; DAMOUR, O.: Pigmented human skin equivalent—as a model of the mechanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. In: *Med Biol Eng Comput* 36 (1998), Nov, Nr. 6, S. 813–820
- [68] VUNJAK-NOVAKOVIC, R.I. ; R.I., Vunjak-Novakovic G. F. (Hrsg.): *Culture of cells for tissue engineering*. Wiley-Liss, 2006
- [69] *Produktinformation Primary Human Keratinocytes, Gibco Invitrogen Corp., 2005*
- [70] TENCHINI, M. L. ; RANZATI, C. ; MALCOVATI, M.: Culture techniques for human keratinocytes. In: *Burns* 18 Suppl 1 (1992), S. S11–S16
- [71] SUN, Tao ; HIGHAM, Mike ; LAYTON, Chris ; HAYCOCK, John ; SHORT, Robert ; MACNEIL, Sheila: Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use. In: *Wound Repair Regen* 12 (2004), Nr. 6, S. 626–634
- [72] BOUKAMP, P. ; PETRUSSEVSKA, R. T. ; BREITKREUTZ, D. ; HORNING, J. ; MARKHAM, A. ; FUSENIG, N. E.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *J Cell Biol* 106 (1988), Mar, Nr. 3, S. 761–771
- [73] GHALBZOURI, Abdoelwaheb E. ; LAMME, Evert ; PONEC, Maria: Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. In: *Cell Tissue Res* 310 (2002), Nov, Nr. 2, S. 189–199
- [74] GHALBZOURI, Abdoelwaheb E. ; PONEC, Maria: Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. In: *Wound Repair Regen* 12 (2004), Nr. 3, S. 359–367

- [75] GROSSMAN, Nili ; BINYAMIN, Li-At ; BODNER, Lipa: Effect of rat salivary glands extracts on the proliferation of cultured skin cells—a wound healing model. In: *Cell Tissue Bank* 5 (2004), Nr. 4, S. 205–212
- [76] ATTAMA, A. A. ; WEBER, C. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Assessment of drug permeation from lipid nanoparticles formulated with a novel structured lipid matrix through artificial skin construct bio-engineered from HDF and HaCaT cell lines. In: *J Drug Del Sci Tech* 18 (3) (2008), S. 181–188
- [77] WINKLER, A. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Comparative permeation studies for delta-aminolevulinic acid and its n-butylester through stratum corneum and artificial skin constructs. In: *Eur J Pharm Biopharm* 53 (2002), May, Nr. 3, S. 281–287
- [78] KACA, Monika ; BOCK, Udo ; JALAL, Mohamed T. ; HARMS, Meike ; HOFFMANN, Christine ; MÜLLER-GOYMANN, Christel ; NETZLAFF, Frank ; SCHÄFER, Ulrich ; LEHR, Claus-Michael ; HALTNER-UKOMADU, Eleonore: The physicochemical parameters of marker compounds and vehicles for use in in vitro percutaneous absorption studies. In: *Altern Lab Anim* 36 (2008), May, Nr. 2, S. 189–200
- [79] SCHÄFER-KORTING, Monika ; BOCK, Udo ; DIEMBECK, Walter ; DÜSING, Hans-Jürgen ; GAMER, Armin ; HALTNER-UKOMADU, Eleonore ; HOFFMANN, Christine ; KACA, Monika ; KAMP, Henricke ; KERSEN, Silke ; KIETZMANN, Manfred ; KORTING, Hans C. ; KRÄCHTER, Hans-Udo ; LEHR, Claus-Michael ; LIEBSCH, Manfred ; MEHLING, Annette ; MÜLLER-GOYMANN, Christel ; NETZLAFF, Frank ; NIEDORF, Frank ; RÜBBELKE, Maria K. ; SCHÄFER, Ulrich ; SCHMIDT, Elisabeth ; SCHREIBER, Sylvia ; SPIELMANN, Horst ; VUIA, Alexander ; WEIMER, Michaela: The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. In: *Altern Lab Anim* 36 (2008), May, Nr. 2, S. 161–187
- [80] IZUMI, Kenji ; FEINBERG, Stephen E.: Skin and oral mucosal substitutes. In: *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 14 (2002), Feb, Nr. 1, S. 61–71
- [81] MACNEIL, Sheila: Progress and opportunities for tissue-engineered skin. In: *Nature* 445 (2007), Feb, Nr. 7130, S. 874–880
- [82] LIMAT, A. ; MAURI, D. ; HUNZIKER, T.: Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. In: *J Invest Dermatol* 107 (1996), Jul, Nr. 1, S. 128–135

- [83] MAZLYZAM, A. L. ; AMINUDDIN, B. S. ; FUZINA, N. H. ; NORHAYATI, M. M. ; FAUZIAH, O. ; ISA, M. R. ; SAIM, L. ; RUSZYMAH, B. H I.: Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. In: *Burns* 33 (2007), May, Nr. 3, S. 355–363
- [84] ANDREADIS, Stelios T.: Experimental models and high-throughput diagnostics for tissue regeneration. In: *Expert Opin Biol Ther* 6 (2006), Nov, Nr. 11, S. 1071–1086
- [85] ZUR MÜHLEN, A. ; KLOTZ, A. ; WEIMANS, S. ; VEEGER, M. ; THÖRNER, B. ; DIENER, B. ; HERMANN, M.: Using skin models to assess the effects of a protection cream on skin barrier function. In: *Skin Pharmacol Physiol* 17 (2004), Nr. 4, S. 167–175
- [86] MÜHLEN, A. Z. ; KLOTZ, A. ; ALLEF, P. ; WEIMANS, S. ; VEEGER, M. ; THÖRNER, B. ; EICHLER, J-O.: Using skin models to assess the effects of a pre-work cream. In: *Curr Probl Dermatol* 34 (2007), S. 19–32
- [87] METCALFE, Anthony D. ; FERGUSON, Mark W J.: Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. In: *J R Soc Interface* 4 (2007), Jun, Nr. 14, S. 413–437
- [88] ANDREADIS, Stelios T.: Gene-modified tissue-engineered skin: the next generation of skin substitutes. In: *Adv Biochem Eng Biotechnol* 103 (2007), S. 241–274
- [89] GEER, David J. ; SWARTZ, Daniel D. ; ANDREADIS, Stelios T.: Fibrin promotes migration in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration. In: *Tissue Eng* 8 (2002), Oct, Nr. 5, S. 787–798
- [90] GARLICK, J. A. ; TAICHMAN, L. B.: Effect of TGF-beta 1 on re-epithelialization of human keratinocytes in vitro: an organotypic model. In: *J Invest Dermatol* 103 (1994), Oct, Nr. 4, S. 554–559
- [91] GHALBZOURI, Abdoelwaheb E. ; HENSBERGEN, Paul ; GIBBS, Sue ; KEMPENAAR, Johanna ; VAN DER SCHORS, Roel ; PONEC, Maria: Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. In: *Lab Invest* 84 (2004), Jan, Nr. 1, S. 102–112
- [92] O'BRIEN, Martha A. ; MORAVEC, Richard A. ; RISS, Terry L. ; BULLEIT, Robert F.: Homogeneous, bioluminescent proteasome assays. In: *Methods Mol Biol* 414 (2008), S. 163–181

- [93] DUCKER, Charles E. ; DRAPER, Jeremiah M. ; XIA, Zuping ; SMITH, Charles D.: In vitro and cellular assays for palmitoyl acyltransferases using fluorescent lipidated peptides. In: *Methods* 40 (2006), Oct, Nr. 2, S. 166–170
- [94] *US-Patent 6,602,677*
- [95] GRIMM, S.: Programmierter Zelltod - Die Apoptose. In: *Chemie in unserer Zeit* 37 (2003), S. 172–178
- [96] KIM, Jung-Eun ; KIM, Song-Ja ; JEONG, Ha-Won ; LEE, Byung-Heon ; CHOI, Je-Yong ; PARK, Rang-Woon ; PARK, Jae Y. ; KIM, In-San: RGD peptides released from beta ig-h3, a TGF-beta-induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. In: *Oncogene* 22 (2003), Apr, Nr. 13, S. 2045–2053
- [97] HICKEY, Thomas E. ; MAJAM, Gary ; GUERRY, Patricia: Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cythoethal distending toxin. In: *Infect Immun* 73 (2005), Aug, Nr. 8, S. 5194–5197
- [98] DECKER, T. ; LOHMANN-MATTHES, M. L.: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. In: *J Immunol Methods* 115 (1988), Nov, Nr. 1, S. 61–69
- [99] MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1983), Dec, Nr. 1-2, S. 55–63
- [100] SLATER, T. F. ; SAWYER, B. ; STRAULI, U.: Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 77 (1963), S. 383–393
- [101] BERRIDGE, M. V. ; TAN, A. S.: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. In: *Arch Biochem Biophys* 303 (1993), Jun, Nr. 2, S. 474–482
- [102] BERRIDGE, M. V. ; TAN, A. S. ; MCCOY, K. D. ; WANG, R.: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. In: *Biochemica* 4 (1996), S. 14–19

- [103] BERRIDGE, M. V. ; HORSFIELD, J. A. ; TAN, A. S.: Evidence that cell survival is controlled by interleukin-3 independently of cell proliferation. In: *J Cell Physiol* 163 (1995), Jun, Nr. 3, S. 466–476
- [104] WASSERMANN, K. ; KULPE, K. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Use of artificial skin constructs for rapid investigation of drug cytotoxicity by an easy in vitro assessment. In: *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334, Suppl. 1 (2001), S. 35
- [105] MCCLUSKEY, C. ; QUINN, J. P. ; MCGRATH, J. W.: An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. In: *Microb Ecol* 49 (2005), Apr, Nr. 3, S. 379–387
- [106] GAUNITZ, Frank ; HEISE, Kerstin: HTS compatible assay for antioxidative agents using primary cultured hepatocytes. In: *Assay Drug Dev Technol* 1 (2003), Jun, Nr. 3, S. 469–477
- [107] O'BRIEN, J. ; WILSON, I. ; ORTON, T. ; POGNAN, F.: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *Eur J Biochem* 267 (2000), Sep, Nr. 17, S. 5421–5426
- [108] GONZALEZ, R. J. ; TARLOFF, J. B.: Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. In: *Toxicol In Vitro* 15 (2001), Jun, Nr. 3, S. 257–259
- [109] *Technical Bulletin CellTiter-Blue Cell Viability Assay, Promega Corporation, USA-Madison.* 2006
- [110] VOYTIK-HARBIN, S. L. ; BRIGHTMAN, A. O. ; WAISNER, B. ; LAMAR, C. H. ; BADYLAK, S. F.: Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts. In: *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34 (1998), Mar, Nr. 3, S. 239–246
- [111] DE WET, J. R. ; WOOD, K. V. ; DELUCA, M. ; HELINSKI, D. R. ; SUBRAMANI, S.: Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. In: *Mol Cell Biol* 7 (1987), Feb, Nr. 2, S. 725–737
- [112] ALBRECHT, Steffen ; ZIMMERMANN, Thomas ; DISTLER, W.: Hormondiagnostik mit Chemilumineszenz. In: *Gynäkologe* 4 (2005), S. 295–303
- [113] FAN, Frank ; WOOD, Keith V.: Bioluminescent assays for high-throughput screening. In: *Assay Drug Dev Technol* 5 (2007), Feb, Nr. 1, S. 127–136

- [114] ADAM, W.: Biologisches Licht. In: *Chemie in unserer Zeit* 7 (1973), S. 182–192
- [115] ALBRECHT, Steffen ; BRANDL, Herbert ; ZIMMERMANN, Thomas: *Chemilumineszenz : Reaktionssysteme und ihre Anwendung unter besonderer Berücksichtigung von Biochemie und Medizin*. Hüthig-Verlag, Heidelberg, 1996
- [116] RÜCKER, G. ; RÜCKER, G. (Hrsg.) ; NEUGEBAUER, M. (Hrsg.) ; WILLEMS, G. G. (Hrsg.): *Instrumentelle Pharmazeutische Analytik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992. – 102–105 S
- [117] CREE, I. A. ; PAZZAGLI, M. ; MINI, E. ; MAZZEI, T. ; HUNTER, E. M. ; SUTHERLAND, L. A. ; PINZANI, P. ; GERLI, A. ; ANDREOTTI, P. E.: Methotrexate chemosensitivity by ATP luminescence in human leukemia cell lines and in breast cancer primary cultures: comparison of the TCA-100 assay with a clonogenic assay. In: *Anticancer Drugs* 6 (1995), Jun, Nr. 3, S. 398–404
- [118] MAEHARA, Y. ; ANAI, H. ; TAMADA, R. ; SUGIMACHI, K.: The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. In: *Eur J Cancer Clin Oncol* 23 (1987), Mar, Nr. 3, S. 273–276
- [119] PETTY, R. D. ; SUTHERLAND, L. A. ; HUNTER, E. M. ; CREE, I. A.: Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. In: *J Biolumin Chemilumin* 10 (1995), Nr. 1, S. 29–34
- [120] CROUCH, S. P. ; KOZLOWSKI, R. ; SLATER, K. J. ; FLETCHER, J.: The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. In: *J Immunol Methods* 160 (1993), Mar, Nr. 1, S. 81–88
- [121] CHEN, L. ; MAO, S. J. ; LARSEN, W. J.: Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter-alpha-trypsin inhibitor family. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Jun, Nr. 17, S. 12380–12386
- [122] POPP, W. ; ZWICK, H.: Unfixed material embedded in a methacrylate resin (Technovit 7100) for immunofluorescent staining. In: *Stain Technol* 62 (1987), Mar, Nr. 2, S. 73–75
- [123] VAN STRAATEN, H. W. ; HEKKING, J. W. ; DRUKKER, J.: The demonstration of acetylcholinesterase in plastic sections. Its application as a marker of early neuronal development. In: *Acta Histochem Suppl* 32 (1986), S. 185–190

- [124] MEYER, W. ; ZSCHEMISCH, N. H.: Remarks on the usefulness of toluidine blue staining for RNA cytophotometry in plastic embedded tissues. In: *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45 (1999), Jun, Nr. 4, S. 379–382
- [125] *Fachinformation Ibutop Creme, Rote Liste Service GmbH Frankfurt, www.fachinfo.de.* 2005
- [126] FRANZ, T. J.: Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. In: *J Invest Dermatol* 64 (1975), Mar, Nr. 3, S. 190–195
- [127] WEBER, C. *Untersuchungen zur Permeation von Rofecoxib durch excidiertes humanes Stratum Corneum.* 2005
- [128] LEVINE, B. ; CAPLAN, Y. H.: Simultaneous liquid-chromatographic determination of five nonsteroidal anti-inflammatory drugs in plasma or blood. In: *Clin Chem* 31 (1985), Feb, Nr. 2, S. 346–347
- [129] WEBER, C. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Comparison of the viability of three cell lines derived from human skin using an ATP-measuring assay. In: *Proceedings 6th International Conference and Workshop on Cell Culture, Saarbrücken*, 2006
- [130] NAG, S. S. ; DAS, S. K.: Identification and quantitation of panthenol and pantothenic acid in pharmaceutical preparations by thin-layer chromatography and densitometry. In: *J AOAC int* 75(5) (1992), S. 898–910
- [131] ZHELEV, Zhivko ; OHBA, Hideki ; BAKALOVA, Rumiana ; HADJIMITOVA, Vera ; ISHIKAWA, Mitsuru ; SHINOHARA, Yasuo ; BABA, Yoshinobu: Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 53 (2004), Mar, Nr. 3, S. 267–275
- [132] SAVIC, S. ; WEBER, C. ; SAVIC, M. ; MÜLLER-GOYMANN, C. C.: Natural surfactant-based topical vehicles: Influence of two different polyols on in vitro / in vivo skin performance. In: *Proceedings 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona*, 2008
- [133] FERRI, C. ; GIUGGIOLI, D. ; SEBASTIANI, M. ; COLACI, M.: Treatment of severe scleroderma skin ulcers with recombinant human erythropoietin. In: *Clin Exp Dermatol* 32 (2007), May, Nr. 3, S. 287–290
- [134] *Rezepturhinweise: Celluloseether; insbesondere Filtrier- bzw. Autoklavierbarkeit und Gelbildung bei Hydroxyethylcellulose-Typen.* Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, 2006 (Neues Rezeptur-Formularium)

- [135] BECKER, K. ; KUSCHMIERZ, B. *Einfluss der Medienosmolalität auf das Wachstumsverhalten und die Viabilität von Zellmonolayern und Hautkonstrukten, Wahlpflichtarbeit TU Braunschweig, 2008*
- [136] SAVINO, R. ; CILIBERTO, G.: A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent. In: *Cell Death Differ* 11 Suppl 1 (2004), Jul, S. S2–S4
- [137] HEESCHEN, Christopher ; AICHER, Alexandra ; LEHMANN, Ralf ; FICHTLSCHERER, Stephan ; VASA, Mariuca ; URBICH, Carmen ; MILDNER-RIHM, Christiane ; MARTIN, Hans ; ZEIHNER, Andreas M. ; DIMMELER, Stefanie: Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. In: *Blood* 102 (2003), Aug, Nr. 4, S. 1340–1346
- [138] BODÓ, Eniko ; KROMMINGA, Arno ; FUNK, Wolfgang ; LAUGSCH, Magdalena ; DUSKE, Ute ; JELKMANN, Wolfgang ; PAUS, Ralf: Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. In: *FASEB J* 21 (2007), Oct, Nr. 12, S. 3346–3354
- [139] EL GHALBZOURI, A. ; GIBBS, S. ; LAMME, E. ; BLITTERSWIJK, C. A. V. ; PONEC, M.: Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. In: *Br J Dermatol* 147 (2002), Aug, Nr. 2, S. 230–243
- [140] HAHNE, M. R. ; REICHL, S.: Influence of dexpanthenol on regeneration of human corneal epithelial monolayers In: *Proceedings DPhG Annual Meeting, Berlin, 2007*
- [141] MANDRACCHIA, V. J. ; SANDERS, S. M. ; FRERICHS, J. A.: The use of becaplermin (rhPDGF-BB) gel for chronic nonhealing ulcers. A retrospective analysis. In: *Clin Podiatr Med Surg* 18 (2001), Jan, Nr. 1, S. 189–209, viii
- [142] WERNER, A. S.: *Establishing a three-dimensional culture of canine corneal cells for in vitro studies on the effects of glucocorticoids*, Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss., 2007
- [143] BRINK, N. ; SZAMEL, M. ; YOUNG, A. R. ; WITTERN, K. P. ; BERGEMANN, J.: Comparative quantification of IL-1beta, IL-10, IL-10r, TNFalpha and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. In: *Inflamm Res* 49 (2000), Jun, Nr. 6, S. 290–296
- [144] BONIFACE, Katia ; BERNARD, François-Xavier ; GARCIA, Martine ; GURNEY, Austin L. ; LECRON, Jean-Claude ; MOREL, Franck: IL-22 inhibits epidermal dif-

ferentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. In: *J Immunol* 174 (2005), Mar, Nr. 6, S. 3695–3702

- [145] BRUEN, Kevin J. ; CAMPBELL, Chris A. ; SCHOOLER, Wesley G. ; DESERES, Suzan ; CAIRNS, Bruce A. ; HULTMAN, C. S. ; MEYER, Anthony A. ; RANDELL, Scott H.: Real-time monitoring of keratin 5 expression during burn re-epithelialization. In: *J Surg Res* 120 (2004), Jul, Nr. 1, S. 12–20

Allgemeine Veröffentlichungen:

- Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Permeation von Rofecoxib durch excidiertes humanes Stratum Corneum“, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2005)